

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 9/90, 15/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO95/26399</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1995年10月5日(05.10.95)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP95/00541 <b>(22) 国際出願日</b> 1995年3月24日(24.03.95)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平6/56271 1994年3月25日(25.03.94) JP 特願平6/216333 1994年9月9日(09.09.94) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 丸金醤油株式会社(MARUKIN SHOYU CO., LTD.)(JP/JP) 〒761-44 香川県小豆郡内海町苗羽甲1850番地 Kagawa, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ)</b> 丸 勇史(MARU, Isafumi) [JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区向島庚申町10 インベリアルパレス リバーサイド415 Kyoto, (JP) 太田泰弘(OHTA, Yasuhiro)[JP/JP] 〒611 京都府宇治市五ヶ庄一番割59-1 壱番館501号 Kyoto, (JP) 塚田陽二(TSUKADA, Yoji)[JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区深草出羽屋敷町23 ファミール伏見B-904 Kyoto, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AU, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title : EPIMERASE</b>  <b>(54) 発明の名称</b> エピメラーゼ  <b>(57) Abstract</b>  An acylglucosamine 2-epimerase, a derivative thereof, a DNA coding for the enzyme, a recombinant vector containing the enzyme, a transformant containing the vector integrated therein, a process for producing the enzyme, and a process for producing N-acetylmannosamine and N-acetylneuraminic acid with the use of a resin-binding protein.		

(57) 要約

アシルグルコサミン2-エヒドメ

ラーゼとその誘導体及び該酵素をコードするDNA、該酵素を含む組換え体ベクター、該ベクターを組み込んだ形質転換体、該酵素の製造方法、レニン結合蛋白を用いたN-アセチルマンノサミン及びN-アセチルノイラミン酸の製造法。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	ML	マリ	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MX	メキシコ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	NE	ニジェール	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NL	オランダ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	US	米国
CN	中国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

WO 95/26399

PCT/JP95/00541

## 明 細 書

## エピメラーゼ

技 術 分 野

本発明は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ及びその誘導体、該  
5 酵素をコードするDNA分子、該DNA分子を組み込んでなる組換え体ベクター、該ベクターを保有する形質転換体及び該エピメラーゼの製造方法に関する。

本発明は、新規ポリペプチド、レニン結合活性を有するアシルグルコサミン2-エピメラーゼ及びその誘導体、該酵素等をコ  
10 ードするDNA分子、該DNA分子を組み込んでなる組換え体ベクター、該ベクターを保有する形質転換体、該エピメラーゼの製造方法、該酵素又はその誘導体を必須成分とする降圧剤、エピメリ化剤並びにN-アセチルマンノサミン及びN-アセチルイラミン酸の製造法に関する。

15 背 景 技 術

N-アセチルイラミン酸は、近年医薬品原料として注目されている。このN-アセチルイラミン酸は、N-アセチルマンノサミンとピルビン酸とから、N-アセチルイラミン酸リアーゼを用いて酵素的に合成できることが知られている。しかし、N-アセチルマンノサミンは高価かつ大  
20 量の入手が困難であるため、安価なN-アセチルグルコサミンとピルビン酸をアシルグルコサミン2-エピメラーゼ及びN-アセチルイラミン酸リアーゼの存在下で反応させてN-アセチルイラミン酸を得る方法が提案され

ている [ウド・クラゲル(Udo Kragl)ら、アングewanデ・ヘミ・インター  
ナショナル・エディション・イン・イングリッシュ(Angewandte Chemi-  
International Edition in English), 30, 827-828  
(1991)]。この方法は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼがN-アセチル  
5 グルコサミンをN-アセチルマンノサミンにエピメリ化することを利用して  
いる。しかしながら、この方法で用いられているアシルグル  
コサミン2-エピメラーゼは動物組織中に微量しか存在しておらず、  
また、その大量生産技術も確立されていないため、実用  
的に使用できるものではない。

10 一方、テシマ(Teshima)ら [クリニカル・ケミストリー(Clinical  
Chemistry), 34, 2291-2294 (1988)] は、N-アセチルノイラミン酸  
の定量にアシルグルコサミン2-エピメラーゼが有効であることを示し  
ており、さらに林ら (特開昭60-186300号公報) は、  
N-アセチルヘキサミンの定量にも該酵素が有用であることを示し  
15 ている。

以上のように、アシルグルコサミン2-エピメラーゼは非常に重要な  
酵素であり、その効率的な製造法の確立が切望されてき  
た。

アシルグルコサミン2-エピメラーゼは、動物の組織に存在すること  
20 が知られており、例えばアシス・ダッタ(Asis Datta) [メソッド・  
イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 41, 407-412  
(1975)] は、ブタの腎臓にアシルグルコサミン2-エピメラーゼが存在

することを報告している。また、ブタ腎臓の他にもヒト  
やラットの腎臓、肝臓、粘膜細胞、顎下腺、太腸及び小  
腸粘膜、唾液腺等に広く存在することも知られている。

しかしながら、動物組織からアシルグルコサミン2-エピメラーゼを  
5 精製するのはきわめて困難であり、現在までのところ粗  
製物の状態でしか得られていない。例えばゴーシュ(Ghosh)  
ら [メソッド・イン・エソザイモロジー-(Methods in Enzymology), 8,  
191-195 (1966)] や、アリス・ダッタ [メソッド・イン・エソザイモロジー-  
(Methods in Enzymology), 41, 407-412 (1975)] は、い  
10 ずれもアシルグルコサミン2-エピメラーゼの単離精製を試みているが、  
ゴーシュの報告では精製の程度が低く、アリス・ダッタも比活  
性で6ユニット/mg蛋白質程度までの精製である。

すなわち、これらの従来技術はブタの腎皮質をホモジ  
ナイザーで抽出した粗抽出液をプロタミン濃縮、ベント  
15 ナイト処理、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー及びリン酸カルシ  
ウムゲル吸着等の通常の精製手段を組み合わせることだ  
けでは、アシルグルコサミン2-エピメラーゼの精製が困難であることを  
示している。

本発明者は、上記従来 of 精製方法に加えてさらにゲル  
20 濾過、ヒドロキシアパタイト及び疎水性ゲル等の各種クロマトグラフィー  
や、クロマトフォーカシングの操作を行ったが、酵素活性の分散化  
や酵素の失活により酵素活性を示さなくなることなどの

WO 95/26399

4

PCT/JP95/00541

ため、該酵素を純粋な形で回収することはできなかった。

アシルグルコサミン2-エポメラーゼは、腎臓中に微量しか存在しないことも精製が困難である原因の1つである。

近年、遺伝子組換え技術の進歩により微生物などを用  
5 いて異種蛋白質を比較的容易に得ることが可能になってきた。しかしながら、この方法を用いるためには目的とする蛋白質を単離することが必要であり、精製度の低い蛋白しか得られていないアシルグルコサミン2-エポメラーゼの場合には、該酵素を特定するための材料、例えばDNAプローブや  
10 抗体を作成することはできない。このような場合には代替手段として部分精製酵素をSDSホリリアクリルアミドゲル電気泳動し、ホリビニリデソジフルオリト(PVDF)膜にブロッティングした後、アミノ酸配列の解析を行い、そのアミノ酸配列を基にDNAプローブを合成して、目的遺伝子の検出を行うこと  
15 が常法である。しかしながら、本酵素の場合には、この方法でもアミノ酸配列を決定することができない。何故なら、アシルグルコサミン2-エポメラーゼは、N末端が何らかの残基でブロックされているためである。

以上のように、アシルグルコサミン2-エポメラーゼに関しては、通  
20 常、遺伝子組換えの手段として用いられる方法のいずれも用いることができず、従って遺伝子組み換え技術による本酵素の製造の道は閉ざされたままであった。

WO 95/26399

5

PCT/JP95/00541

本発明は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを大量且つ安価に製造する方法を提供することを目的とする。

また本発明は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを提供することを目的とする。

5 さらに本発明は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を提供することを目的とする。

さらにまた本発明は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を組み込んだ組換え体ベクターを提供することを目的とする。

10 さらにまた本発明は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を組み込んだ組換え体ベクターを細胞に導入してなる形質転換体を提供することを目的とする。

さらにまた本発明は、降圧剤を提供することを目的とする。

15 さらにまた本発明は、N-アセチルグルコサミンをN-アセチルマンノサミンに変換する新規エピメリ化剤を提供することを目的とする。

さらにまた、本発明は、N-アセチルマンノサミンの製造法を提供することを目的とする。

さらにまた、本発明は、N-アセチルノイラミンの製造法を提供  
20 することを目的とする。

さらにまた、本発明は、新規ポリペプチドを提供することを目的とする。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、 $\alpha$ -シロガラクトサミン2-エピメラーゼの塩基配列とアミノ酸配列を示す図である。

図 2 は、プラスミド pEPI1 の制限地図を示す図である。

5     なお、図 2 中、□は、ベクター DNA である pBluescript を示し、■は、挿入された DNA を示す。また、AGE は  $\alpha$ -シロガラクトサミン2-エピメラーゼをコード化している遺伝子の領域を示し、Plac は、lac プロモーターを示している。

図 3 は、組換え体プラスミドで形質転換された細胞と  
10   非形質転換細胞の抽出液をそれぞれ N-アセチルマンノサミンを基質とした反応液中で反応し、その反応液を PMP 化の後 HPLC で分析したクロマトグラムを示す図である。図 3 中の GlcNAc は、PMP 化された N-アセチルガラクトサミンを示し、ManNAc は、PMP 化された N-アセチルマンノサミンを示している。

15   図 4 は、純化したブタの腎臓由来の  $\alpha$ -シロガラクトサミン2-エピメラーゼと細胞抽出液を SDS-電気泳動し、ウイスタンブロット後の免疫染色を示す図である。

図 4 中、レーン 1 は純化したブタ腎臓由来の  $\alpha$ -シロガラクトサミン2-エピメラーゼである。レーン 2 は、*Escherichia coli* の抽出液で  
20   ある。レーン 3 は、pEPI1 で形質転換した *Escherichia coli* の抽出液である。レーン 4 は、pEPI14 で形質転換した *Escherichia coli* の抽出液である。



図 5 は、部分精製酵素をヒドロキシアパタイトカラムに通液した後、溶出したときのパターンを示す図である。実線は280nmの紫外線吸収から測定できる蛋白質の溶出を示し、破線はアシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を示した。集めた画分を矢印 5 で示した。

### 発 明 の 開 示

本発明者は、上記従来技術に鑑み鋭意検討を重ねた結果、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを抗体の製造が可能となる程度まで精製し、該抗体を用いた遺伝子組換えの方法によりアシルグルコサミン2-エピメラーゼのクローン化及び製造を行った。また、得られたアシルグルコサミン2-エピメラーゼの生物活性について種々検討した結果、意外にもアシルグルコサミン2-エピメラーゼはレニン結合活性を有することが判明した。本発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。

すなわち、本発明は、下記の項1.～項22.に記載のアシルグルコサミン2-エピメラーゼ及びその誘導体、該酵素をコードするDNA分子、該DNA分子を組み込んでなる組換え体ベクター、該ベクターを保有する形質転換体および該酵素の製造方法、並びに該酵素を有効成分とする降圧剤、エピメリ化剤及びN-アセチルノイラミンおよびN-アセチルマンノサミンの製造法を提供するものである。

項 1. 実質的に純粋なアシルグルコサミン2-エピメラーゼ。

項 2. 下記式(A)のアミノ酸配列又はその一部が置換又は  
欠失されたアミノ酸配列を含むアシルグルコサミン2-エピメラーゼ又は  
は該酵素活性を有する誘導体（但し、下記のアミノ酸配  
列の一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列は、アシルグル  
5 コサミン2-エピメラーゼ活性を有する）：

## (A)

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ala Trp Lys  
Glu Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Arg Val Met Ala  
Phe Trp Leu Glu His Ser His Asp Arg Glu His Gly  
10 Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Asp Gly Arg Val  
Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg  
Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Lys Leu  
Glu Arg Phe His Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Ala  
Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Arg His Ala Arg  
15 Val Ala Pro Pro Glu Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Ser  
Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
Glu Leu Trp Arg Val Thr Ala Glu Ala Arg Tyr Gln  
Ser Glu Ala Val Asp Met Met Asp Gln Ile Val His  
20 Trp Val Arg Glu Asp Pro Ser Gly Leu Gly Arg Pro  
Gln Leu Pro Gly Ala Val Ala Ser Glu Ser Met Ala  
Val Pro Met Met Leu Leu Cys Leu Val Glu Gln Leu

WO 95/26399

9

PCT/JP95/00541

Gly Glu Glu Asp Glu Glu Leu Ala Gly Arg Tyr Ala  
Gln Leu Gly His Trp Cys Ala Arg Arg Ile Leu Gln  
His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn  
Val Ser Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ser Gly Cys Leu  
5 Gly Arg His Gln Asn Pro Gly His Ala Leu Glu Ala  
Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Ser Ser Arg Ser Gly  
Asp Ala Lys Leu Arg Ala His Val Ile Asp Thr Phe  
Leu Leu Leu Pro Phe Arg Ser Gly Trp Asp Ala Asp  
His Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Gly  
10 Leu Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Ala Met Lys Leu  
Trp Trp Pro His Ser Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu  
Met Gly Tyr Ser Glu Ser Gly Asp Pro Ala Leu Leu  
Arg Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe Arg  
Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
15 Tyr Leu Asn Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Thr Ile  
Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Glu Met Leu Ser Ala  
Leu Leu Ser Arg Leu Ala

項 3. アシルグルコサミン2-ヒメラーゼをコードする DNA 分子。

- 20 項 4. 上記式(A)のアミノ酸配列をコードする塩基配列又はその一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む項 3 に記載の DNA 分子

WO 95/26399

10

PCT/JP95/00541

(但し、上記式(A)のアミノ酸配列の一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列をコードする塩基配列は、アシルグルコサミド2-エポメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする)。

項5. 下記式(X)の塩基配列を有する請求項4に記載のDNA分子。

(X)

```
ATG GAG AAG GAG CGC GAA ACT CTG CAG GCC TGG AAG
GAG CGT GTG GGC CAA GAG CTG GAC CGC GTG ATG GCT
TTC TGG CTG GAG CAC TCC CAC GAT CGG GAG CAC GGG
10 GGC TTC TTC ACG TGC CTG GGC CGC GAC GGG CGG GTG
TAT GAC GAC CTC AAG TAC GTC TGG CTG CAG GGG AGG
CAG GTG TGG ATG TAC TGT CGC CTG TAC CGC AAG CTT
GAG CGC TTC CAC CGC CCT GAG CTT CTG GAT GCG GCT
AAA GCA GGG GGC GAA TTT TTG CTG CGC CAT GCC CGA
15 GTG GCA CCT CCT GAA AAG AAG TGT GCC TTT GTG CTG
ACG CGG GAC GGC CGG CCC GTC AAG GTG CAG CGG AGC
ATC TTC AGT GAG TGC TTC TAC ACC ATG GCC ATG AAC
GAG CTG TGG AGG GTG ACG GCG GAG GCA CGG TAC CAG
AGC GAA GCG GTG GAC ATG ATG GAT CAG ATC GTG CAC
20 TGG GTG CGA GAG GAC CCC TCT GGG CTG GGC CGG CCC
CAG CTC CCC GGG GCC GTG GCC TCG GAG TCC ATG GCA
GTG CCC ATG ATG CTG CTG TGC CTG GTG GAG CAG CTC
```

WO 95/26399

11

PCT/JP95/00541

GGG GAG GAG GAC GAG GAG CTG GCA GGC CGC TAC GCG  
CAG CTG GGG CAC TGG TGC GCT CGG AGG ATC CTG CAG  
CAC GTC CAG AGG GAT GGA CAG GCT GTG CTG GAG AAT  
GTG TCG GAA GAT GGC GAG GAA CTT TCT GGC TGC CTG  
5 GGG AGA CAC CAG AAC CCA GGC CAC GCG CTG GAA GCT  
GGC TGG TTC CTG CTC CGC CAC AGC AGC CGG AGC GGT  
GAC GCC AAA CTT CGA GCC CAC GTC ATC GAC ACG TTC  
CTG CTA CTG CCT TTC CGC TCC GGA TGG GAC GCT GAT  
CAC GGA GGC CTC TTC TAC TTC CAG GAT GCC GAT GGC  
10 CTC TGC CCC ACC CAG CTG GAG TGG GCC ATG AAG CTC  
TGG TGG CCG CAC AGC GAA GCC ATG ATC GCC TTT CTC  
ATG GGC TAC AGT GAG AGC GGG GAC CCT GCC TTA CTG  
CGT CTC TTC TAC CAG GTG GCC GAG TAC ACG TTT CGC  
CAG TTT CGT GAT CCC GAG TAC GGG GAA TGG TTT GGC  
15 TAC CTG AAC CGA GAG GGG AAG GTT GCC CTC ACT ATC  
AAG GGG GGT CCC TTT AAA GGC TGC TTC CAC GTG CCG  
CGG TGC CTT GCC ATG TGC GAA GAG ATG CTG AGC GCC  
CTG CTG AGC CGC CTC GCC TAG

項 6. アシルグルコサミン2-エポメラーゼをコードするDNA分子が  
20 組み込まれた組換え体ベクター。

項 7. 前記DNA分子が、前記式(A)のアミノ酸配列をコ  
ードする塩基配列又はその一部が置換又は欠失されたア

ミノ酸配列をコードする塩基配列を含む項 6 に記載の組換え体ベクター。

(但し、上記式(A)のアミノ酸配列の一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列をコードする塩基配列は、 $\alpha$ -シルク $\beta$ -グルコサミン2-エピ $\alpha$ -メラゼ活性を有するポリペプチドをコードする。)

項 8. 前記 DNA が、前記式(X)の塩基配列を含む項 7 に記載の組換え体ベクター。

項 9. 項 3 に記載の DNA 分子を含む組換え体ベクターを細胞に導入してなる形質転換体。

10 項 10.  $\alpha$ -シルク $\beta$ -グルコサミン2-エピ $\alpha$ -メラゼをコードする DNA 分子を組み込んだ組換え体ベクターを細胞に導入して形質転換体とし、該形質転換体を培地に培養し、培養物中に $\alpha$ -シルク $\beta$ -グルコサミン2-エピ $\alpha$ -メラゼを生成蓄積させ、該培養物から $\alpha$ -シルク $\beta$ -グルコサミン2-エピ $\alpha$ -メラゼを採取する $\alpha$ -シルク $\beta$ -グルコサミン2-エピ $\alpha$ -メラゼの製造方法。

項 11. レニン結合活性を有する $\alpha$ -シルク $\beta$ -グルコサミン2-エピ $\alpha$ -メラゼ。

項 12. 下記(1)～(3)のいずれかに記載のポリペプチドを必須成分とする項 11 に記載のエピメラゼ。

(1)前記式(A)で表されるアミノ酸配列を必須配列とする  
20 ポリペプチド；

(2)前記式(A)で表されるアミノ酸配列の10位、13位、21位、23位、27位、33位、45位、47位、51位、71位、72位、

76-79位、93位、94位、101位、110位、120位、136位、  
137位、139位、141位、142位、145位、149位、155位、  
159位、162位、163位、171位、173位、174位、176位、  
178位、187位、195位、199-202位、205位、208位、212位、  
5 224位、232位、234位、237位、243位、249位、258-261  
位、263位、266位、267位、269位、270位、272位、275位、  
282位、287-289位、300位、301位、309位、317位、318位、  
328位、329位、334位、337位、348位、363位、364位、  
371位、392位、393位、395位、399位、401位及び402位か  
10 らなる群から選ばれる少なくとも1つの位置が置換又は  
欠失されたポリペプチド；あるいは  
(3)式(A)で表されるポリペプチドのN末端又はC末端に  
Pro Ala Pro Ser Pro Ala Pro Thr Pro Ala Cys  
Arg Gly Ala Glu；Pro Ala Pro Leu Gly Ser Leu Pro  
15 Ala Val Pro Thr Arg Glu Gly Ser Lys；またはLys Gly  
Asn Lys Ser Trp Gln Aspが付加したポリペプチド。；  
(但し、前記式(A)の一部が置換又は欠失されたポリペプ  
チドは、アシルグルコサミン2-エポメラーゼ活性を有する。)  
項13. 下記(1)～(3)のいずれかのポリペプチド(但し、  
20 一般式(R-1)、(R-2)及び(R-3)で表されるポリペプチドを  
除く)。  
(1)前記式(A)で表されるアミノ酸配列を必須配列とする

WO 95/26399

14

PCT/JP95/00541

ポリペプチド；

(2)前記式(A)で表されるアミノ酸配列の10位、13位、21位、23位、27位、33位、45位、47位、51位、71位、72位、76-79位、93位、94位、101位、110位、120位、136位、137位、139位、141位、142位、145位、149位、155位、159位、162位、163位、171位、173位、174位、176位、178位、187位、195位、199-202位、205位、208位、212位、224位、232位、234位、237位、243位、249位、258-261位、263位、266位、267位、269位、270位、272位、275位、282位、287-289位、300位、301位、309位、317位、318位、328位、329位、334位、337位、348位、363位、364位、371位、392位、393位、395位、399位、401位及び402位からなる群から選ばれる少なくとも1つの位置が置換又は欠失されたポリペプチド；あるいは

(3)前記式(A)で表されるポリペプチドのN末端又はC末端にPro Ala Pro Ser Pro Ala Pro Thr Pro Ala Cys Arg Gly Ala Glu；Pro Ala Pro Leu Gly Ser Leu Pro Ala Val Pro Thr Arg Glu Gly Ser Lys；またはLys Gly Asn Lys Ser Trp Gln Aspが付加したポリペプチド；

20

(R-1)

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ala Trp Lys  
Glu Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Arg Val Val Ala



WO 95/26399

15

PCT/JP95/00541

Phe Trp Met Glu His Ser His Asp Gln Glu His Gly  
Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Glu Gly Arg Val  
Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg  
Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Thr Phe  
5 Glu Arg Phe Arg His Ala Gln Leu Leu Asp Ala Ala  
Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Arg Tyr Ala Arg  
Val Ala Pro Pro Gly Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Thr  
Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
10 Glu Leu Trp Arg Ala Thr Gly Glu Val Arg Tyr Gln  
Thr Glu Ala Val Glu Met Met Asp Gln Ile Val His  
Trp Val Gln Glu Asp Ala Ser Gly Leu Gly Arg Pro  
Gln Leu Gln Gly Ala Pro Ala Ala Glu Pro Met Ala  
Val Pro Met Met Leu Leu Asn Leu Val Glu Gln Leu  
15 Gly Glu Ala Asp Glu Glu Leu Ala Gly Lys Tyr Ala  
Glu Leu Gly Asp Trp Cys Ala Arg Arg Ile Leu Gln  
His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn  
Val Ser Glu Gly Gly Lys Glu Leu Pro Gly Cys Leu  
Gly Arg Gln Gln Asn Pro Gly His Thr Leu Glu Ala  
20 Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Cys Ile Arg Lys Gly  
Asp Pro Glu Leu Arg Ala His Val Ile Asp Lys Phe  
Leu Leu Leu Pro Phe His Ser Gly Trp Asp Pro Asp

WO 95/26399

16

PCT/JP95/00541

His Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Asn  
Phe Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Ala Met Lys Leu  
Trp Trp Pro His Ser Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu  
Met Gly Tyr Ser Asp Ser Gly Asp Pro Val Leu Leu  
5 Arg Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe Arg  
Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
Tyr Leu Ser Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Ser Ile  
Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Glu Met Leu Gly Ala  
10 Leu Leu Ser Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Ala  
Pro Thr Pro Ala Cys Arg Gly Ala Glu

( R - 2 )

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Val Trp Lys  
15 Gln Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Ser Val Ile Ala  
Phe Trp Met Glu His Ser His Asp Gln Glu His Gly  
Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Asp Gly Gln Val  
Tyr Asp His Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg  
Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Thr Phe  
20 Glu Arg Phe Arg Arg Val Glu Leu Leu Asp Ala Ala  
Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Ser Tyr Ala Arg  
Val Ala Pro Pro Gly Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu

WO 95/26399

17

PCT/JP95/00541

Thr Gln Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Thr  
Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
Glu Leu Trp Lys Val Thr Gly Glu Met His Tyr Gln  
Arg Glu Ala Val Glu Met Met Asp Gln Ile Ile His  
5 Trp Val Arg Glu Asp Pro Ala Gly Leu Gly Arg Pro  
Gln Leu Ser Gly Thr Leu Ala Thr Glu Pro Met Ala  
Val Pro Met Met Leu Leu Asn Leu Val Glu Gln Leu  
Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Thr Asp Lys Tyr Ala  
Glu Leu Gly Asp Trp Cys Ala His Arg Ile Leu Gln  
10 His Val Gln Arg Asp Gly Gln Val Val Leu Glu Asn  
Val Ser Glu Asp Gly Lys Glu Leu Pro Gly Cys Leu  
Gly Arg His Gln Asn Pro Gly His Thr Leu Glu Ala  
Gly Trp Phe Leu Leu Gln Tyr Ala Leu Arg Lys Gly  
Asp Pro Lys Leu Gln Arg His Ile Ile Asp Lys Phe  
15 Leu Leu Leu Pro Phe His Ser Gly Trp Asp Pro Glu  
His Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Asp  
Leu Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Asn Met Lys Leu  
Trp Trp Pro His Thr Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu  
Met Gly Tyr Arg Asp Ser Gly Asp Pro Ala Leu Leu  
20 Asn Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe His  
Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
Tyr Leu Asn Gln Glu Gly Lys Val Ala Leu Thr Ile

WO 95/26399

18

PCT/JP95/00541

Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
 Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Gln Ile Leu Gly Ala  
 Leu Leu Gln Arg Leu Gly Pro Ala Pro Leu Gly Ser  
 Leu Pro Ala Val Pro Thr Arg Glu Gly Ser Lys

5

( R - 3 )

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ala Trp Lys  
 Glu Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Arg Val Met Ala  
 Phe Trp Leu Glu His Ser His Asp Arg Glu His Gly  
 10 Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Asp Gly Arg Val  
 Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg  
 Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Lys Leu  
 Glu Arg Phe His Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Ala  
 Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Arg His Ala Arg  
 15 Val Ala Pro Pro Glu Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
 Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Ser  
 Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
 Glu Leu Trp Arg Val Thr Ala Glu Ala Arg Tyr Gln  
 Ser Glu Ala Val Glu Met Met Asp Gln Ile Val His  
 20 Trp Val Arg Glu Asp Pro Ser Gly Leu Gly Arg Pro  
 Gln Leu Pro Gly Ala Val Ala Ser Glu Ser Met Ala  
 Val Pro Met Met Leu Leu Cys Leu Val Glu Gln Leu

WO 95/26399

19

PCT/JP95/00541

Gly Glu Glu Asp Glu Glu Leu Ala Gly Arg Tyr Ala  
 Gln Leu Gly His Trp Cys Ala Arg Arg Ile Leu Gln  
 His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn  
 Val Ser Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ser Gly Cys Leu  
 5 Gly Arg His Gln Asn Pro Gly His Ala Leu Glu Ala  
 Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Ser Ser Arg Ser Gly  
 Asp Ala Lys Leu Arg Ala His Val Ile Asp Thr Phe  
 Leu Leu Leu Pro Phe Arg Ser Gly Trp Asp Ala Asp  
 Tyr Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Gly  
 10 Leu Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Ala Met Lys Leu  
 Trp Trp Pro His Arg Gln Ala Met Ile Ala Phe Leu  
 Met Gly Tyr Ser Glu Ser Gly Asp Pro Ala Leu Leu  
 Arg Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe Arg  
 Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
 15 Tyr Leu Asn Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Thr Ile  
 Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
 Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Glu Met Leu Ser Ala  
 Leu Leu Ser Arg Leu Ala

項14. 項13に記載のポリペプチドをコードするDNA分  
 20 子。

項15. 前記式(X)で表される塩基配列を有する項14に記載  
 のDNA分子。

項16. 項14又は15に記載のアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子が組み込まれた組換え体ベクター。

項17. 項16に記載の組換え体ベクターを細胞に導入してなる形質転換体。

- 5 項18. 項12に記載のレニン結合活性を有するアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を組み込んだ組換え体ベクターを細胞に導入して形質転換体とし、該形質転換体を培地に培養し、培養物中にアシルグルコサミン2-エピメラーゼを生成蓄積させ、該培養物からアシルグルコサミン2-エピメラーゼを  
10 採取することを特徴とするレニン結合活性を有するアシルグルコサミン2-エピメラーゼの製造方法。

項19. 項11又は12に記載のアシルグルコサミン2-エピメラーゼ又はその誘導体を必須成分とする降圧剤。

- 項20. レニン結合活性を有する蛋白質を必須成分とする、  
15 N-アセチルグルコサミンからN-アセチルマンノサミンへの変換を行うエピメリ化剤。

項21. N-アセチルグルコサミンにレニン結合活性を有する蛋白質を作用させることを特徴とするN-アセチルマンノサミンの製造法。

- 項22. N-アセチルグルコサミンとピルビン酸にレニン結合活性を有  
20 する蛋白質及びN-アセチルノイラミン酸を作用させることを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

なお、上記の蛋白質(R-1)、(R-2)及び(R-3)は、レニン

結合活性を有することは知られていたが (H. Inoue et al., J. Biochem., 110, p. 493-500 (1991))、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有することは全く知られていなかった。従って、本発明のN-アセチルマンノサミンの製造法及びN-アセチル  
5 ノイラミンの製造法に用いられる「レニン結合活性を有する蛋白質」には、上記の蛋白質(R-1)、(R-2)及び(R-3)が含まれる。

本発明は、上記蛋白質(R-1)、(R-2)及び(R-3)からなる群から選ばれる少なくとも1種を作用させることを特徴  
10 とするN-アセチルマンノサミンの製造法を提供するものである。

また、本発明は、N-アセチルグルコサミンとピルビン酸に上記蛋白質(R-1)、(R-2)及び(R-3)からなる群から選ばれる少なくとも1種及びN-アセチルノイラミン2-エピメラーゼを作用させることを特徴とするN-アセチルノイラミンの製造法を提供するものである。

15 本発明のエピメリ化剤の必須成分である「レニン結合活性を有する蛋白質」には、上記の蛋白質(R-1)、(R-2)及び(R-3)が含まれる。

従って、本発明は、上記蛋白質(R-1)、(R-2)及び(R-3)からなる群から選ばれる少なくとも1種を必須成分とする、N-アセチルグルコサミンからN-アセチルマンノサミンへの変換を行うエピ  
20 メリ化剤を提供するものである。

本発明の新規ポリペプチドは、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ

として有用である。

なお、上記項 1～10は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性のみを有していればよく、レニン結合活性の有無とは無関係のものであり、以下”第1発明”と称する。

- 5     また、上記項 11～22は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性とレニン結合活性の両方を有するものであり、以下”第2発明”と称する。

また、”本発明”は、第1発明及び第2発明の両方を含むものである。

- 10     第1発明のアシルグルコサミン2-エピメラーゼは、少なくともその一部のものは、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性とレニン結合活性の両方を有するが、該エピメラーゼはレニン結合活性の有無にかかわらず、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する蛋白質を全て含む。
- 15     本発明において、アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を組み込んだプラスミドで形質転換される細胞としては、大腸菌、枯草菌、緑膿菌、放線菌及び乳酸菌などの細菌、かびや酵母及び他の真核微生物、マウス細胞、ラット繊維芽細胞およびCOS細胞等の哺乳類由来の培養細胞、及び植物細胞などのプラスミドが安定に保持され、機能する細胞であれば、本願に例示した細胞に限定されない。
- 20



本発明で、 $\alpha$ -シルク $\alpha$ -グルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を組み込んだプラスミドを上記細胞に導入する方法としては、当業者であれば細胞の種類に応じて適宜適切な方法を選択することができ、例えば大腸菌の場合ではハナハン (Hanahan) の方法 [DNAクローニング (DNA Cloning)、第1巻、p 109 - 136 (1985)] などにより行うことができる。

本発明は、 $\alpha$ -シルク $\alpha$ -グルコサミン2-エピメラーゼを初めて実質的に不純物を含まない形態で単離し、その製造方法を開示したものであり、該エピメラーゼの少なくとも一部がレニン結合活性を有することも本発明で初めて明らかにされた。 $\alpha$ -シルク $\alpha$ -グルコサミン2-エピメラーゼ活性及びレニン結合活性を有するものであれば、そのアミノ酸配列に関わらず第2発明の範囲に包含される。例えば、本発明では、図1に示すアミノ酸配列及び塩基配列を有する $\alpha$ -シルク $\alpha$ -グルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子の5'末端及び／又は3'末端をエキソ型ヌクレアーゼなどにより数個から百数十個程度切断して短くしたDNA分子および該DNAによりコードされるN末端又はC末端の数個ないし数十個のアミノ酸が削除された該酵素の誘導体も、該酵素活性を保持している限り本発明の範囲に含まれる。また、公知の方法により部分的突然変異を起こさせ、該アミノ酸配列の内部

の 1 個又はそれ以上を突然変異により他のアミノ酸に置換し又は欠失させたポリペプチドも、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する限り、本発明の範囲に包含される。

置換及び／又は欠失の可能な位置としては、例えば、

- 5 前記一般式 (A) で表されるポリペプチドの 10 位、13 位、21 位、23 位、27 位、33 位、45 位、47 位、51 位、71 位、72 位、76-79 位、93 位、94 位、101 位、110 位、120 位、136 位、137 位、139 位、141 位、142 位、145 位、149 位、155 位、159 位、162 位、163 位、171 位、173 位、174 位、176 位、
- 10 178 位、187 位、195 位、199-202 位、205 位、208 位、212 位、224 位、232 位、234 位、237 位、243 位、249 位、258-261 位、263 位、266 位、267 位、269 位、270 位、272 位、275 位、282 位、287-289 位、300 位、301 位、309 位、317 位、318 位、328 位、329 位、334 位、337 位、348 位、363 位、364 位、
- 15 371 位、392 位、393 位、395 位、399 位、401 位及び 402 位が例示されるが、これらに限定されない。

- さらに、本発明は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有するポリペプチドの N 末端及び／又は C 末端にさらに数個から数十個のアミノ酸を付加したものもアシルグルコサミン2-
- 20 エピメラーゼ活性を有する限り包含する。

本発明で用いられるアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードする核酸分子の供与体としては、特に限定されるものでは

WO 95/26399

25

PCT/JP95/00541

ないが、例えばブタ腎臓やヒトやラットの腎臓、肝臓、  
粘膜細胞、顎下腺、大腸および小腸の粘膜、唾液腺などの  
該酵素活性を有する動物組織等が挙げられる。これらの  
動物組織から該核酸分子を得る。核酸分子としては、  
5 DNAとRNAが挙げられるが、好ましくはRNAである。

アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするRNAは、チョムツキンス  
キ-(Chomczynski)らの方法〔アナリティカル・バイオケミストリー  
(Analytical Biochemistry), 162, 156-159, (1987)]に  
従って取得することができる。該RNA分子は、さらに、  
10 モレキュラー・クロニング(Molecular Cloning)第2版、第1巻、第  
7.26項～7.29項に記載の方法によりポリアデニル酸テール  
(ポリAテール)を有するRNAとしても得ることができる。そして、このポリAテールを有するRNAを用いること  
により容易にアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするcDNAを  
15 得ることができる。

RNAからcDNAへの変換は、例えばカレント・プロトコルズ・イン・  
モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular  
Biology)、第1巻、5.5.1-5.5.10(1990)に従い行うこと  
ができる。また、市販のcDNA合成キット(例えば、アマ  
20 ーシャム社製、ストラタジーン社製など)を用いて行う  
こともできる。

cDNAは、ある種のベクター、例えばファージベクター

やプラスミドベクターに挿入することによって、cDNAライブラリーを構築することができる。cDNAライブラリーの構築は、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版、第2巻、第8.1項～8.86項に記載の方法等により行うことができる。

構築されたcDNAライブラリーから、アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするcDNAを保有する形質転換体を選択する手段が必要である。この酵素は、上述のように上記文献記載の精製手段では、遺伝子組換えの分野で必要とされる程度にまで精製された酵素は得られない。本発明者は、以下のような方法を用いて抗体産生が可能な程度にまで純化したアシルグルコサミン2-エピメラーゼを得た。

先ず、アリス・タッタ [メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 41, 407-412 (1975)] の方法に準じて、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを部分的に精製する。この後の精製工程は、精製の過程で活性を有する画分が分散していくため、活性が高く、蛋白質量の少ない画分、すなわち、溶出した試料の比活性(蛋白質1mg当たりの活性)が、カラムに通液前の試料の比活性よりも高い画分のみを得ることとした。具体的には、上記部分精製試料についてヒドロキシアパタイトカラム及びイオン交換カラムクロマトグラフィーをこの順に行い、分散して溶出される該酵素の活性の最も高い画分の

一部を取り出し、さらにイオン交換カラムによる分離を  
2回繰り返すことにより、該酵素が純化されることを見  
出した。得られた酵素画分をさらに、逆相カラム（マイクロ  
ボンドスファア-C4（ミリポア社製））を用いた高速液体クロマト  
5 グラフィー（HPLC）により精製し、実質的に不純物を含まない  
純化された該酵素蛋白質を得ることができる。逆相HPLC  
で精製すると酵素は失活しやすいために酵素の精製には  
殆ど用いられていない。アシルグルコサミン2-エピメラーゼの場合に  
おいても酵素活性は失われるが、抗体の生産を惹起する  
10 能力は維持される。このため、HPLCで精製したアシルグルコサ  
ミン2-エピメラーゼをウサギに免疫することにより、該酵素蛋  
白質に特異的に反応する抗体を得ることができる。

上記の精製工程により、例えばブタの腎皮質5.6kgから、  
10.5mgの精製された該酵素蛋白質を得ることができる。

15 本発明のアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子は、  
構築したcDNAから単離することができる。単離の方法は、  
ベクターとして $\lambda$ gt11や $\lambda$ ZAP等の発現ベクターを使用する  
ことにより、抗体を用いた検出が可能である。アシルグルコサ  
ミン2-エピメラーゼをコードするDNAを保有する形質転換体は、  
20 イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドにさらされることにより  
アシルグルコサミン2-エピメラーゼを産生する。これを抗体に結合さ  
せ、さらにアルカホスファターゼが結合した抗ウサギ抗体を結合

させ5-フロモ-4-クロロ-3-イントリルリン酸溶液とニトロフル-テトラゾリウム溶液を反応させることにより、該酵素をコードするDNAを保有する組換え体を選択し、取得することができる。

- 得られたアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAがプラスミドDNA中に挿入されている場合には、該DNAを有する大腸菌をそのまま適当な培地中で培養することにより、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを得ることができる。また、λZAPをベクターとして使用した場合、取得したDNAを含有するファージとf1ヘルパ-ファージを同時感染させることにより、
- 10 該DNAを含むプラスミドへと切り出すことも可能である。
- これら一連の操作により、例えば式(X)で表される
- 1.2kbpのアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAを含有する新規な組換え体プラスミドを取得することができる。

- 次に、上記の様にして得られたアシルグルコサミン2-エピメラーゼ
- 15 をコードするDNA断片が挿入されたプラスミドを用いて大腸菌等の細胞を形質転換する。形質転換された細胞からアシルグルコサミン2-エピメラーゼを生産するには、下記のようにして形質転換された細胞を培養し、培養細胞を得る。

- 培養条件は、形質転換される細胞の種類により異なり、
- 20 当業者であれば、細胞の種類に応じて、容易に培養条件を定めることができる。例えば、大腸菌の場合には、通常の固体培養法で培養してもよいが、液体培養法を用い

- て培養するのが望ましい。また、大腸菌の場合を例にとると、培養に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機化合物その他の栄養成分を含み、細菌の培養に一般的に用いられている合成培地、半合成培地、或いは天然
- 5 培地のいずれも使用することができる。上記培地に使用できる炭素源としては、ブドウ糖、果糖、転化糖、澱粉、糖化液、ソルビトール、グリセロールなどの糖質液や、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸等の有機酸等を例示することができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、
- 10 塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、尿素等を例示できる。炭素源としても窒素源としても利用できるものとしては、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどを例示できる。無
- 15 機化合物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸第二鉄、塩化第二鉄、硫酸マンガン、塩化マンガンなどを例示できる。
- 20 形質転換された細胞の培養時間及び培養温度は特に制限されないが、例えば該細胞が大腸菌の場合、通常20℃～42℃前後、好ましくは30℃～37℃前後で、通常4～48時

間、好ましくは8～14時間培養する。このような条件下で、通常の振盪培養或いは通気攪拌培養にて培養する。

本発明のアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAを適当なベクターと連結し、適当な宿主細胞に形質転換すると、  
5 形質転換された宿主細胞の内部又は外部の該酵素濃度を高めることができ、該酵素を効率的に生産することができる。

本発明に用いられるベクターは、以下の要素を備えている。すなわち、形質転換される宿主細胞内で該酵素を  
10 コードするDNAを発現させる正しい配向と配置を備えたプロモーター及び翻訳活性化配列を備えている。これらの要素を備えたベクターであれば、どのようなベクターであってもよいが、好ましいベクターとしては適当な選択マーカーを有し、多コピーのものが好適で、例えば  
15 pBluescript, pUC18, pUC19, pKK223-3及びpTrc99A等が挙げられる。これらのベクターを使用した場合、  
イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドを培養液の培地に、  
0.01mM～100mM、好ましくは0.1mM～10mM程度添加することにより、アシルグルコサミン2-エピメラーゼの細胞内濃度を増大さ  
20 せることができる。また、熱誘発性の発現ベクターであるpPL-lambdaも使用することができる。このベクターを使用した場合、培養液の温度を40～45℃に上昇させるこ



とにより、アシルグルコサミン2-エピメラーゼの細胞内濃度を増大させることができる。

さらに、宿主細胞のアシルグルコサミン2-エピメラーゼの細胞内濃度を増大させる手段として、アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAの末端DNAを削除することによっても、該酵素の生産性を増大させ、且つ効率化することができる。

例えば、該DNA分子の5'末端及び／又は3'末端をエキソ型ヌクレアーゼなどによりアシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を失わない程度に分解することにより、アシルグルコサミン2-エピメラーゼの産生能をさらに高めることもできる。また、部位指定突然変異やランダムな突然変異を導入することによって、内部DNAを置換又は欠失させることにより、該酵素の生産能を高めることもできる。例えば、該DNA分子をpBluescriptやM13のような1本鎖になり得るベクターに導入し、該DNA分子を含む1本鎖DNAを調製する。この1本鎖DNAに変異しようとする配列を含むか又は欠失した配列を含むオリゴヌクレオチドをアニールした後、これをプライマーとして、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、ATP、DNAポリメラーゼのクレノー断片及びT4リガーゼ存在下でプライマー伸長反応を行うことにより、部分的突然変異を導入することができる。

一方、アシルグルコサミン2-エピメラーゼは、培養によって得られ

る細胞から抽出することができる。抽出は、細胞からの  
通常の酵素抽出法に従い行うことができる。例えば、超  
音波処理、各種機械的処理、酵素処理などの方法により  
細胞を破碎し、不溶物を遠心分離などにより分離した上  
5 清に該酵素を回収することができる。回収された粗酵素  
は、一般的な酵素精製法を適宜選択、組み合わせること  
により、精製することができる。例えば、除核酸処理、  
硫安処理、珪藻土処理、イオン交換クロマトグラフィー等により、純化  
されたアシルグルコサミン2-エポメラーゼを大量に得ることができる。

10 なお、図1に示すDNA分子を組み込んだ、図2のpEPI1  
を含む大腸菌株は、平成6年3月11日に通産省工業技  
術院生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号：  
FERM BP-4602が付された。

本発明者は、第2発明で得られたブタ腎臓由来の一般  
15 式(A)のポリペプチドの生物活性について種々検討した結  
果、該酵素はアシルグルコサミン2-エポメラーゼ活性だけでなく、レ  
ニン結合活性をも有することが明らかになった。ここで  
レニン結合活性とは、該ポリペプチドがレニンに結合し、  
レニン活性を阻害することを言う。一般式(A)のポリペプ  
20 チドは、本発明のアシルグルコサミン2-エポメラーゼの製造法に従い  
得られた。一方、ブタ腎臓由来の一般式(R-3)のレニン結  
合蛋白は井上らの方法(H. Inoue et al., J. Biochem.,

110. p. 493-500, (1991))に従い得られた。精製方法の異なる両蛋白質(A)及び(R-3)は、149位、289位、317位及び318位の4個のアミノ酸を除いて同一の配列を有する極めて類似した蛋白質である。一方、以下の実施例で示されるように、本発明で得られた蛋白質(A)及びラット腎臓由来のエピメラーゼは、いずれもレニン結合活性を有している。このことから、少なくとも一部の蛋白質についてはアシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性とレニン結合活性は不可分のものであり、蛋白質(A)と構造の類似した公知のレニン結合蛋白質(R-1)、(R-2)および(R-3)はいずれもエピメラーゼ活性を有していると考えられる。

従って、レニン結合蛋白質が、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有するときには、レニン結合蛋白質はN-アセチルグルコサミンからN-アセチルマンノサミンへの変換を触媒するエピメリ化剤として使用することもできる。

一般式(A)の蛋白質は、10位、13位、21位、23位、27位、33位、45位、47位、51位、71位、72位、76-79位、93位、94位、101位、110位、120位、136位、137位、139位、141位、142位、145位、149位、155位、159位、162位、163位、171位、173位、174位、176位、178位、187位、195位、199-202位、205位、208位、212位、224位、232位、234位、237位、243位、249位、258-261位、263位、266

位、267位、269位、270位、272位、275位、282位、287-  
289位、300位、301位、309位、317位、318位、328位、  
329位、334位、337位、348位、363位、364位、371位、  
392位、393位、395位、399位、401位及び402位のいずれ  
5 かの部位において公知の蛋白である(R-1)、(R-2)および  
(R-3)と異なっている。しかしながら、これら蛋白質は、  
いずれもレニン結合活性及びエピメラーゼ活性を有して  
いるため、これらの部位は活性の発現に必須ではなく、  
置換又は欠失が可能である。また、N末端、C末端に数  
10 個から数十個のアミノ酸が付加しても蛋白質の活性発現  
には影響しない。なお、本発明者は実際に一般式(A)のポ  
リペプチドのN末端にLys Gly Asn Lys Ser Trp Gln As  
pのアミノ酸を付加したエピメラーゼを得ているが、該エ  
ピメラーゼが十分な酵素活性を有することは確認されて  
15 いる。

本発明は、動物の組織に存在するアシルグルコサミン  
2-エピメラーゼをコードするDNA分子を分離し、該  
DNA分子を有する組換えプラスミドを作成し、このプ  
ラスミドを大腸菌などの宿主細胞内に導入して細胞を形  
20 質転換し、該形質転換体を培養することにより、アシルグル  
コサミン2-エピメラーゼを細胞内に大量に且つ効率的に生産させ、  
これを採取する方法を開示する。

レニン、血液中のアンギオテンシノーゲンを加水分解してアンギオテンソンを生成する。アンギオテンソンはさらにアンギオテンソン変換酵素によってアンギオテンソニンとなり、末梢血管の平滑筋を直接収縮させ、強い昇圧作用を発現する。また、副腎皮質球状層に作用し、アルドステロンの分泌を促進する。このように、レニン・アンギオテンシン系は、血圧の調節に重要な役割を果たしており、現在レニン・アンギオテンシン系の阻害剤が開発され、その薬剤が高血圧治療薬（降圧剤）として広く利用されている。本発明のアシルグルコサミン2-エピメラーゼは、レニンに結合しその活性を阻害することから、降圧剤として有用である。

レニン結合蛋白質は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する。従って、レニン結合蛋白質は、例えばN-アセチルグルコサミンをN-アセチルマンノサミンに変換するエピメリ化剤として使用できる。すなわち、レニン結合蛋白質をN-アセチルグルコサミンに作用させると、N-アセチルマンノサミンが得られる。さらにまた、レニン結合蛋白質をN-アセチルイラミジン酸とともに、N-アセチルグルコサミン及びピルビン酸に作用させると、まず、レニン結合蛋白質によりN-アセチルグルコサミンがN-アセチルマンノサミンに変換され、次いで、N-アセチルイラミジン酸の作用によりN-アセチルマンノサミンとピルビン酸が結合してN-アセチルイラミジン酸が得られる。

本発明によれば、以下のような優れた効果が達成され

る。

(1)高度に精製されたアシルグルコサミン2-エピメラーゼを安価且つ大量に製造することができる。

(2)微生物を出発原料とするため、動物組織を原料とする  
5 従来法と異なり、原料供給の制約を受けることなく、必要なときに必要な場所で所望量の生産が可能である。

(3)アシルグルコサミン2-エピメラーゼの生産量が高いため、容易に該酵素を単離できる。

(4)高純度のアシルグルコサミン2-エピメラーゼを安価に得ることがで  
10 きるため、該酵素を用いてN-アセチルイラミン酸やN-アセチルマンノサミンを安価に製造できる。

(5)高純度のアシルグルコサミン2-エピメラーゼを得ることができるため、N-アセチルイラミン酸やN-アシルヘキソサミンの定量に利用できる。

(6)本発明のレニン結合活性を有する蛋白質を用いること  
15 により降圧剤を得ることができる。

(7)レニン結合活性を有する蛋白質は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性をも有するため、該蛋白質は、N-アセチルグルコサミンからN-アセチルマンノサミンへのエピメリ化剤として使用できる。

(8)レニン結合活性を有する本発明の蛋白質と、N-アセチルイラミン酸リアーゼを、場合によりアルカリ性条件下にN-アセチルグルコサミン及びピルビン酸と反応させることにより、効率よく  
20 N-アセチルイラミン酸を得ることができる。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

#### 5 ブタの腎臓由来のアシルグルコサミン2-エポメラーゼ

(1) ブタの腎臓由来のアシルグルコサミン2-エポメラーゼの精製

新鮮なブタの腎皮質(5.6kg)に3mMのリン酸緩衝液(pH7.6)12リットルを加えてホモジナイザーで均一化した。連続遠心分離(10,000rpm、200ml/分)により上清(11リ  
10 ットル)を得た後、上清と等量の冷却した蒸留水を加えてよく攪拌し、連続遠心分離(10,000rpm、200ml/分)によって得られた上清を腎臓抽出液とした。この腎臓抽出液をアリス・ダッタの方法 [モッサ・イン・エンザイモロジー-(Methods in Enzymology), 41, 407-412 (1975)] に従ってプロタミ  
15 ン濃縮、ペントナイト処理、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー処理及びリン酸カルシウムゲル処理により、アシルグルコサミン2-エポメラーゼの精製を行い、387mgの部分精製酵素を得た。

次に、該部分精製酵素を10mMのリン酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(内径26mm×長さ95mm; 和光  
20 純薬社製)に通液し、同緩衝液で溶出した。本処理により該酵素活性を有する画分は広く分散した状態で溶出された(図5参照)。該酵素活性を有する第12~17画分

- (18ml×6=108ml)を硫酸アンモニウムにより塩析処理し、硫酸アンモニウム0から80重量%飽和沈殿画分を集め、20mMのリン酸緩衝液(pH7.6)で透析を行い、透析酵素75.6mgを得た。さらに、以下に示す条件でイオン交換
- 5 クロマトグラフィーを行うことにより、該酵素をさらに精製した。
- まず、イオン交換体の1種であるQ-セファロース(ファルマシア社製)を内径26mm×長さ100mmのカラムに充填し、20mMのリン酸緩衝液(pH7.6、500ml)を通して平衡化した。次いで、上記部分精製酵素75.6mgを該カラム
- 10 に吸着させ、100mMから300mMの塩化カリウムを含むリン酸緩衝液(pH7.6)の直線的濃度勾配溶出法にて溶出した。塩化カリウムの濃度が180mM付近に溶出される蛋白質の主ピーク(198ml)を集めて濃縮及び透析を行った。この透析処理酵素23.0mgをモノQカラム(ファルマシア社製)に通液することにより、該カラム中に吸着させた。次いで
- 15 吸着された酵素を200mMから300mMの塩化カリウムを含むリン酸緩衝液(pH7.6)の直線的濃度勾配溶出法により溶出した。塩化カリウム濃度が220mM付近に溶出される蛋白質のピークを集めて、ゲル濾過カラムによる脱塩を行った。
- 20 得られた該酵素15.9mgの活性は、比活性で21ユニット/mg蛋白質で、前述のアシタタの報告にある活性(6ユニット/mg蛋白質)よりも3.5倍もの純度の高い酵素が得られ



た。さらに、低分子量の物質や微量の不純物を除くため、逆相カラムを用いたHPLCによる精製を行った。逆相カラムは、マイクロボンドスフェア-5 $\mu$ C4-300オングストローム（内径3.9mm×長さ150mm）（ミリポア社製）を使用し、0.1%(V/V)のトリフルオロ酢酸(TFA)水溶液で平衡化したこのカラムへ、  
5 リフルオロ酢酸(TFA)水溶液で平衡化したこのカラムへ、精製酵素2mgを注入した。カラム内に保持された該精製酵素は、0から80%(V/V)のアセトニトリルを含む0.1%(V/V)のTFA水溶液の直線的濃度勾配溶出法により溶出し、  
280nmの紫外線吸収から測定できる蛋白質の主ピークを集  
10 めて減圧乾燥した。同操作を6回繰り返すことにより得られた酵素(10.5mg)は、活性は失っていたが実質的に不純物を含まない純化された蛋白質であった。

#### (2)アシルグルコサミン2-エピメラーゼに特異的に結合する抗体

純化した5.2mgのアシルグルコサミン2-エピメラーゼを、生後9週齢  
15 のウサギ（日本白色種）に免疫し、部分採血及び全採血により、約150mlの抗血清を得た。該抗血清から日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、(1992)、第24頁の記載を参考にして、プロテインAセファロース（ファルマシア社製）を用いてIgGを精製した。

#### 20 実施例 2

##### アシルグルコサミン2-エピメラーゼのcDNAのクローニング

##### (1)ブタの腎臓からのmRNAの取得

ブタの腎臓から腎皮質を切り取り、腎皮質2gから上記のチョムツクシンスキ-(Chomczynski)らの方法〔アナリティカル・バイオケミストリー-(Analytical Biochemistry), 162, 156, (1987)〕により4.9mgのRNAを取得した。さらに、この

5 RNAをオリゴdTセルロースカラムに吸着、溶出することにより、67μgのポリAテールを有するRNAを取得した。

### (2)cDNAライブラリーの作成

上記で得られたポリAテールを有するRNA(5μg)から、ストラタジーン社製のZAP-cDNA合成キットを用いて、

10 cDNAライブラリーを作成した。得られたライブラリーは、 $4.5 \times 10^{12}$ プラーク形成単位であった。

### (3)アシルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子のスクリーニング

アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAを有する組換え体のスクリーニングは、実施例1記載の抗体と、ストラ

15 タジーン社製のヒコフール-イムノスクリーニングキットを用いた免疫染色法により行った。

上記方法により、約120万個のプラークをスクリーニングしたところ、64個の陽性ファージを取得した。この陽性ファージのうち、任意に12株を選択し、エシエリヒ7・コリに

20 f1ヘルパ-ファージとともに感染することにより、プラスミドへの切り出しを行った。このプラスミドを有するエシエリヒ7・コリのうち、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する株を選び

出し、プラスミドを取り出したところ、1.4kbpの挿入断片を有する組換えプラスミドpEPI1(4.3kbp)を取得した。pEPI1の制限酵素地図を図2に示す。

このpEPI1(4.3kbp)を導入した組換え大腸菌は、FERM BP-4602の受託番号で、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に1994年3月11日に寄託された。

#### (4) アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性の測定

エシェリヒア・コリ中のアシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を調べるため、プラスミドpEPI1で形質転換したエシェリヒア・コリXL1-Blueを100mg/リットルのアンピシリンを含むLB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)に接種し、振盪することにより培養を行った。また、より効率よく該酵素を生産させるために、培養開始時にイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドを最終濃度が1mMとなるように培地へ添加した37℃で12時間培養の後、遠心分離(5000rpm, 10分間)により菌体をペレット化した。この菌体を超音波破碎することによって、細胞抽出液を得ることができる。この細胞抽出液は、40mMのN-アセチルマンノサミン(ナカライテスク社製)又は40mMのN-アセチルグルコサミン(ナカライテスク社製)、4mMのアデノシン-三リン酸(興人社製)、10mMの塩化マグネシウムおよび100mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)の存在下(最終容積0.5ml)で37℃、30分間反応した。得ら

- れた反応混合物を沸騰水中で3分間煮沸することにより、  
反応を停止した。次いで、この反応混合物から、遠心分離（12,000rpm, 5分間）によって得られた反応上清液の  
N-アセチルマンノサミンまたはN-アセチルグルコサミンを測定することにより、
- 5 該酵素の活性を測定した。但し、N-アセチルマンノサミンとN-アセチルグルコサミンを、そのままHPLCで分離することは困難である。  
これらの化合物をホンダ(Honda)ら〔アナリティカル・バイオケミストリ - (Analytical Biochemistry), 180, 351-357 (1989) に記載〕の方法に従って1-フェニル-3-メチル-5-ヒドロキシロン(PMP)誘導
- 10 体とするために、10 $\mu$ lの上記反応上清液を1.5ml容のマイクロチューブ（エッペンドルフ社製）に移し、減圧乾燥後、50 $\mu$ lの0.5M PMPメタノール溶液と50 $\mu$ lの0.3M NaOH水溶液を添加し、70℃で30分間反応した。この反応液を室温で10分間冷却後、150 $\mu$ lの0.1M塩酸水溶液で中和した。
- 15 中和した溶液に200 $\mu$ lのクロロホルムを添加し、混合することにより、未反応のPMPはクロロホルム層に、また、誘導体化したN-アセチルヘキサミンは水層に分離した。クロロホルム層を取り除いた後に、水層を減圧乾燥した。乾燥物を250 $\mu$ lの蒸留水に溶解し、そのうち10 $\mu$ lをHPLCに注入することにより分離、定量した。HPLC分析は、LC-6Aシステム（島津製作所社製）とカラム〔コスモシル5C18-AR（内径6.0mm×長さ150mm）（ナカライテスク社製）〕を用いて
- 20

行い、移動相は、アセトニトリルと50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の2対8の混合液であり、この移動相を1ml /分の流速で送液した。検出は、245nmにおける紫外線の吸収量により測定した。また、該酵素活性を示す単位は5 ユニットであり、1ユニットは、N-アセチルマンノサミンを基質として反応し、1分間あたりに1 $\mu$ molのN-アセチルグルコサミンを生成する活性と定義した。

その結果、N-アセチルマンノサミンが反応混合物に含まれている場合には、細胞抽出液の存在下、N-アセチルマンノサミンはN-アセチルグルコサミンに変換した(図3参照)。同様にN-アセチルグルコサミンは、細胞抽出液の存在下、N-アセチルマンノサミンに変換した。各々の反応において、N-アセチルグルコサミン対N-アセチルマンノサミンは、75対25の平衡状態に達した。上記の細胞抽出液を前記混合物に添加しなかったときは、変換が全く見られなかった。その上、純化したアシルグルコサミン2-エポメラーゼに対する抗体は、ウエスタンブロットにおいて、約45000ダルトンのバンドと反応した(図4参照)。これらの試験結果は、全体的に見て、クローン化された遺伝子が、アシルグルコサミン2-エポメラーゼ活性に対応する蛋白質を生産していることを示している。また、細胞抽出液のアシルグルコサミン2-エポメラーゼ活性は、培養液1リットル当たり10ユニットの生産が認められ、比活性は0.03U/mgと、ブタの腎皮質の抽出液とほぼ同程度

である。このことは、従来動物の組織でしか得られなかったアシルグルコサミン2-エピメラーゼが、プラスミド pEPI1 で形質転換された微生物で生産できることを示している。

#### (5) アシルグルコサミン2-エピメラーゼの塩基配列の決定

- 5 pEPI1 の EcoRI から XhoI の制限酵素切断部位間に挿入されたアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコード化する DNA を含有する約 1.4 kbp の DNA 断片をサンガー (Sanger) ら [Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 5463-5467 (1977)] に記載の方法を基本原理とするジデオキシ法により、塩基配列を
- 10 決定した。pEPI1 に使用されているベクターは、1 本鎖ベクターとなりうる pBluescript であるため、このベクターのままデिलーショソミュタソを作成し、常法に従い塩基配列の決定を行った。アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコード化している塩基配列を図 1 に示した。また、該酵素をコード化し
- 15 る塩基配列を図 1 に示した。また、該酵素をコード化している塩基配列から翻訳されて得られるポリペプチドのアミノ酸配列も同時に示した。

#### 実施例 3

#### 微生物によるアシルグルコサミン2-エピメラーゼの生産

- 20 (1) アシルグルコサミン2-エピメラーゼ高生産プラスミドの構築

上記プラスミド pEPI1 のデिलーショソプラスミドを構築することにより、アシルグルコサミン2-エピメラーゼの微生物による高生産

が可能となった。プラスミド pEP11(20 $\mu$ g)の500 $\mu$ l溶液中  
で100ユニットの SacI と100ユニットの XbaI の制限酵素を  
用いて37℃で4時間切断した。制限酵素処理液を75℃で  
15分間処理した後、フェノール/クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノ  
ールで沈殿した。沈殿物を1 $\mu$ g/ $\mu$ lになるように滅菌水に  
溶解したものを、エキソ/マンガン・デイリー・ソリューション(ストラタジ  
ン社製)を用いて、数十種のデイリー・ソリューション・プラスミドを作成し、  
このうちプラスミド pEP114が、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを  
高生産することを認めた。プラスミド pEP114で形質転換  
されたエシェリヒア・コリ XL1-Blue を、100 $\mu$ g/ml のアンピシリン及  
び1mM のイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドが入った LB 培地で、  
37℃、12時間培養し、その培養物のペレットから細胞抽  
出液を調製した。細胞抽出液のアシルグルコサミン2-エピメラーゼ活  
性は、培養液1リットル当たり約1000ユニットの生産が認  
められ、比活性は1.6U/mgと、ブタの腎皮質の抽出液の約  
53倍の上昇が認められた。

## (2) アシルグルコサミン2-エピメラーゼの生産

プラスミド pEP114は、エシェリヒア・コリ中で、多量のアシルグル  
コサミン2-エピメラーゼを生産する有効な手段を提供する。  
エシェリヒア・コリを培養し、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを得ることは、  
動物組織から得るよりもはるかに容易である。

培養は、100mg/リットルのアンピシリン及び1mM のイソプロピル

ル-β-D-チオガラクトピラノシドを含むLB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)1リットルを2本の2リットル容振盪フラスコに入れ、それぞれにプラスミドpEP114で形質転換した*Escherichia coli* XL1-Blueを接種し、振盪することにより行った。37℃で12時間培養を行った後、遠心分離にて培養物を集め、生理食塩水で2回洗浄した。培養物を、1mMのEDTA及び0.05%の2-メルカプトエタノールが入った50mMのリン酸緩衝液(pH7.6)50mlに懸濁し、超音波発生装置(UR-200 P, トミー精工社製)により培養物を破碎後、遠心分離にて沈殿物を除き、細胞抽出液を得た。細胞抽出液に、0.03%(W/V)になるようにプロタミン硫酸(ナカライテスク社製)を添加し、遠心分離で上清を得ることにより、除核酸処理を行った。上清は、硫酸アンモニウムにより塩析処理し、硫酸アンモニウム20~80%飽和画分を集め、上記リン酸緩衝液に対し透析を行った。透析処理液は、上記リン酸緩衝液で平衡化したDEAE-セルロース(ワットマン社製)カラム(直径5cm×高さ10cm)に通液して吸着させた。吸着した蛋白質の溶出は、通液している上記リン酸緩衝液に適度な濃度の塩化カリウムを添加することにより行った。アシルグルコサミン2-エポメラーゼ活性は、75~100mMの塩化カリウム濃度で溶出されたため、この活性画分を集め、メンブラソフィルター(分画分子量10000、アミコン社製)で濃縮



及び脱塩した後、上記リン酸緩衝液で平衡化したQ-セ  
ファロース（ファルマシア社製）カラム（内径1cm×直径  
5cm）に通液した。吸着した蛋白質の溶出は、100mMの塩  
化カリウムを添加した上記リン酸緩衝液と、300mMの塩化  
5 カリウムを添加した上記リン酸緩衝液の直線的濃度勾配  
溶出法により、溶出した。アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性画  
分を集め、上記メンブランフィルターで濃縮及び脱塩することによ  
り、純化したクローン化アシルグルコサミン2-エピメラーゼを  
約700ユニット（33mg）得ることができた。

#### 10 実施例 4

##### ラット腎臓由来アシルグルコサミン2-エピメラーゼの精製

ラットの腎臓（300g）を用いて、実施例1(1)と同様に  
して、ラット由来のアシルグルコサミン2-エピメラーゼの精製を行っ  
た。但し、実施例1(1)にある逆相カラム（マイクロボントラス7E7  
15 -5 $\mu$ C4）による精製工程は、酵素が失活するため行わず、  
モノQカラムで再度精製することにより、アシルグルコサミン2-  
エピメラーゼ（0.15mg）を得た。

#### 実施例 5

##### アシルグルコサミン2-エピメラーゼによるレニン活性の阻害(1)

20 40 $\mu$ lの緩衝液A（0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液  
（pH6.5）、1mM EDTA、1 $\mu$ Mロイペプチン、0.05%牛血清アル  
ブミン）中に、2.5mUの市販のレニン（シグマ社製）及び

0-25pmolの実施例 3 で得られたクローン化アシルグルコサミン2-  
 エピメラーゼを加え、37℃で1時間反応した。反応後、  
 960 $\mu$ lの冷却した緩衝液 A を加え、全量を1mlとした。

250 $\mu$ lの緩衝液 A 中に、得られた反応希釈液の一部

- 5 (25 $\mu$ l)と0.4mg/mlのアングiotenシン-ゲン(シグマ社製)及び終  
 濃度2.5mMになるようにフッ化フェニルメチルスルホニルを加え、37℃で  
 30分間反応した。該溶液を沸騰水中で3分間処理して反  
 応を停止し、遠心分離(14000rpm、10分)後、上清液に遊離  
 するアングiotenシン I を定量した。結果を表 1 に示す。

10

表 1

クローン化エピメラーゼ (pmol)	レニンの残存活性 (%)
0	100
1	87
3	66
10	54
25	48

15

## 実施例 6

### アシルグルコサミン2-エピメラーゼによるレニン活性の阻害(2)

- 実施例 3 で得られたクローン化アシルグルコサミン2-エピメラーゼ  
 の代わりに実施例 4 で得られたラットのアシルグルコサミン2-  
 20 エピメラーゼを用いた他は、実施例 5 と同様にして、アシルグル  
 コサミン2-エピメラーゼによるレニンの阻害活性を測定した。結  
 果を表 2 に示す。

表 2

ラット腎臓エビメラーゼ (pmol)	レニンの残存活性 (%)
0	100
1	98
10	88
50	48

5

## 実施例 7

レニンとアシルグルコサミン2-エピメラーゼの結合反応(1)

100 $\mu$ lの緩衝液 A 中に、25mUのレニン（シグマ社製）及び140pmolの実施例 3 で得られたクローン化アシルグルコサミン2-エピメラーゼを加え、37℃で1時間反応した。

上記の100 $\mu$ lの反応液を、ゲル濾過クロマトグラフィー〔カラム、Superose 12HR 10/30；移動相、50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）-150mM塩化ナトリウム；流速1ml/分；検出、紫外線（280nm）〕により分画し、各画分のレニン活性を測定することにより、レニンの分子量変化を測定した。

上記ゲル濾過クロマトグラフィーで溶出された画分は、実施例 5 の方法に準じてレニン活性を測定した。その結果、  
20 アシルグルコサミン2-エピメラーゼ無添加の場合は、レニンの分子量に相当する約40000ダルトンの位置にレニン活性が溶出された。しかし、アシルグルコサミン2-エピメラーゼを添加した場合は、

約60000ダルトンの位置にレニン活性が溶出し、該酵素が  
レニンに結合して高分子化することが認められた。

本実験で得られた高分子化したレニンの分子量は、  
Takahashiら [J. Biochem., 93, 1583-1594 (1983)] が  
5 報告したレニン結合蛋白質とレニンの複合体である高分  
子型(HMW)レニンのゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量(約  
60000ダルトン)とよく一致した。よって、アシルグルコサミン2  
-エヒメラーゼはレニン結合活性を有していた。

#### 実施例 8

##### 10 レニンとアシルグルコサミン2-エヒメラーゼの結合反応(2)

実施例 3 で得られたクローン化アシルグルコサミン2-エヒメラーゼ  
の代わりに実施例 4 で得られたラットのアシルグルコサミン2-  
エヒメラーゼを用いた他は、実施例 7 と同様にしてゲル濾過  
クロマトグラフィーによる分子量の測定を行った。その結果、実  
15 施例 7 と同様にレニンの分子量が約60000ダルトンに高分  
子化した。

#### 実施例 9

##### レニン結合活性を有する蛋白質を用いたN-アセチルマンノサミンの 製造法

20 安価なN-アセチルグルコサミンからN-アセチルマンノサミンの製造を行った。  
10gのN-アセチルグルコサミン、5mgの実施例 3 で得たレニン結合活  
性を有する蛋白質、4mM ATP及び10mM MgCl<sub>2</sub>の水溶液

100mlをpH7.5に調整し、37℃で24時間反応した。反応液は減圧濃縮し、シロップを得た。得られたシロップに40mlのエタノールを加えて沸騰水浴中10分間加温した後、4℃で3時間放置した。N-アセチルグルコサミンは不溶性、N-アセチルマンノサミンは可溶性であることから沈殿物(N-アセチルグルコサミン)を濾過により取り除き、濾液を減圧濃縮することにより純度91%以上のN-アセチルマンノサミン2gを得た。

#### 実施例 10

##### レニン結合活性を有する蛋白質を用いたシアル酸の製造

10 安価なN-アセチルグルコサミンとピルビン酸からレニン結合活性を有する蛋白質とN-アセチルノイロミン酸アゼを作用させ、N-アセチルノイロミン酸の製造を行った。

5mM ATP及び5mM MgCl<sub>2</sub>を含む50mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)にN-アセチルグルコサミン22g及びピルビン酸11gを溶解し、  
15 この溶液に15mgの実施例3で得たレニン結合活性を有する蛋白質及び、500ユニットのN-アセチルノイロミン酸アゼを加えて全量を0.5リットルとし、30℃、48時間反応を行った。反応後の反応液中には12.4gのN-アセチルノイロミン酸が生成した。Dowex11(ダウケミカル社製)によるイオン交換クロマトグラフィー  
20 により反応物を単離し、濃縮後、凍結乾燥により10.3gのN-アセチルノイロミン酸を得た。

WO 95/26399

52

PCT/JP95/00541

# 請 求 の 範 囲

- ① アシルグルコサミン2-エピメラーゼ。
- ② 下記(1)～(3)のいずれかのアシルグルコサミン2-エピメラーゼ；  
(1)下記式(A)で表されるアミノ酸配列を必須配列とする  
5 アシルグルコサミン2-エピメラーゼ；  
(2)下記式(A)で表されるアミノ酸配列の10位、13位、21  
位、23位、27位、33位、45位、47位、51位、71位、72位、  
76-79位、93位、94位、101位、110位、120位、136位、  
137位、139位、141位、142位、145位、149位、155位、  
10 159位、162位、163位、171位、173位、174位、176位、  
178位、187位、195位、199-202位、205位、208位、212位、  
224位、232位、234位、237位、243位、249位、258-261  
位、263位、266位、267位、269位、270位、272位、275位、  
282位、287-289位、300位、301位、309位、317位、318位、  
15 328位、329位、334位、337位、348位、363位、364位、  
371位、392位、393位、395位、399位、401位及び402位か  
らなる群から選ばれる少なくとも1つの位置が置換又は  
欠失されたアシルグルコサミン2-エピメラーゼ；あるいは  
(3)下記式(A)で表されるポリペプチドのN末端又はC末  
20 端にPro Ala Pro Ser Pro Ala Pro Thr Pro Ala Cys  
Arg Gly Ala Glu；Pro Ala Pro Leu Gly Ser Leu Pro  
Ala Val Pro Thr Arg Glu Gly Ser Lys；またはLys Gly

WO 95/26399

53

PCT/JP95/00541

Asn Lys Ser Trp Gln Aspが付加したアシルアルコサミン2-エトキシ  
レート ;

( A )

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ala Trp Lys  
5 Glu Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Arg Val Met Ala  
Phe Trp Leu Glu His Ser His Asp Arg Glu His Gly  
Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Asp Gly Arg Val  
Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg  
Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Lys Leu  
10 Glu Arg Phe His Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Ala  
Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Arg His Ala Arg  
Val Ala Pro Pro Glu Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Ser  
Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
15 Glu Leu Trp Arg Val Thr Ala Glu Ala Arg Tyr Gln  
Ser Glu Ala Val Asp Met Met Asp Gln Ile Val His  
Trp Val Arg Glu Asp Pro Ser Gly Leu Gly Arg Pro  
Gln Leu Pro Gly Ala Val Ala Ser Glu Ser Met Ala  
Val Pro Met Met Leu Leu Cys Leu Val Glu Gln Leu  
20 Gly Glu Glu Asp Glu Glu Leu Ala Gly Arg Tyr Ala  
Gln Leu Gly His Trp Cys Ala Arg Arg Ile Leu Gln  
His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn

WO 95/26399

54

PCT/JP95/00541

Val Ser Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ser Gly Cys Leu  
 Gly Arg His Gln Asn Pro Gly His Ala Leu Glu Ala  
 Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Ser Ser Arg Ser Gly  
 Asp Ala Lys Leu Arg Ala His Val Ile Asp Thr Phe  
 5 Leu Leu Leu Pro Phe Arg Ser Gly Trp Asp Ala Asp  
 His Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Gly  
 Leu Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Ala Met Lys Leu  
 Trp Trp Pro His Ser Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu  
 Met Gly Tyr Ser Glu Ser Gly Asp Pro Ala Leu Leu  
 10 Arg Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe Arg  
 Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
 Tyr Leu Asn Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Thr Ile  
 Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
 Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Glu Met Leu Ser Ala  
 15 Leu Leu Ser Arg Leu Ala

③ アシルグルコサミン2-エトメラゼをコードするDNA分子。

④ 上記式(A)のアミノ酸配列をコードする塩基配列又はその一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む請求項3に記載のDNA分子。

20 (但し、上記式(A)のアミノ酸配列の一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列をコードする塩基配列は、アシルグルコサミン2-エトメラゼ活性を有するポリペプチドをコードする)



⑤ 下記式(X)の塩基配列を有する請求項4に記載のDNA分子。

(X)

```
ATG GAG AAG GAG CGC GAA ACT CTG CAG GCC TGG AAG
5 GAG CGT GTG GGC CAA GAG CTG GAC CGC GTG ATG GCT
TTC TGG CTG GAG CAC TCC CAC GAT CGG GAG CAC GGG
GGC TTC TTC ACG TGC CTG GGC CGC GAC GGG CGG GTG
TAT GAC GAC CTC AAG TAC GTC TGG CTG CAG GGG AGG
CAG GTG TGG ATG TAC TGT CGC CTG TAC CGC AAG CTT
10 GAG CGC TTC CAC CGC CCT GAG CTT CTG GAT GCG GCT
AAA GCA GGG GGC GAA TTT TTG CTG CGC CAT GCC CGA
GTG GCA CCT CCT GAA AAG AAG TGT GCC TTT GTG CTG
ACG CGG GAC GGC CGG CCC GTC AAG GTG CAG CGG AGC
ATC TTC AGT GAG TGC TTC TAC ACC ATG GCC ATG AAC
15 GAG CTG TGG AGG GTG ACG GCG GAG GCA CGG TAC CAG
AGC GAA GCG GTG GAC ATG ATG GAT CAG ATC GTG CAC
TGG GTG CGA GAG GAC CCC TCT GGG CTG GGC CGG CCC
CAG CTC CCC GGG GCC GTG GCC TCG GAG TCC ATG GCA
GTG CCC ATG ATG CTG CTG TGC CTG GTG GAG CAG CTC
20 GGG GAG GAG GAC GAG GAG CTG GCA GGC CGC TAC GCG
CAG CTG GGG CAC TGG TGC GCT CGG AGG ATC CTG CAG
CAC GTC CAG AGG GAT GGA CAG GCT GTG CTG GAG AAT
```

WO 95/26399

56

PCT/JP95/00541

GTG TCG GAA GAT GGC GAG GAA CTT TCT GGC TGC CTG  
 GGG AGA CAC CAG AAC CCA GGC CAC GCG CTG GAA GCT  
 GGC TGG TTC CTG CTC CGC CAC AGC AGC CGG AGC GGT  
 GAC GCC AAA CTT CGA GCC CAC GTC ATC GAC ACG TTC  
 5 CTG CTA CTG CCT TTC CGC TCC GGA TGG GAC GCT GAT  
 CAC GGA GGC CTC TTC TAC TTC CAG GAT GCC GAT GGC  
 CTC TGC CCC ACC CAG CTG GAG TGG GCC ATG AAG CTC  
 TGG TGG CCG CAC AGC GAA GCC ATG ATC GCC TTT CTC  
 ATG GGC TAC AGT GAG AGC GGG GAC CCT GCC TTA CTG  
 10 CGT CTC TTC TAC CAG GTG GCC GAG TAC ACG TTT CGC  
 CAG TTT CGT GAT CCC GAG TAC GGG GAA TGG TTT GGC  
 TAC CTG AAC CGA GAG GGG AAG GTT GCC CTC ACT ATC  
 AAG GGG GGT CCC TTT AAA GGC TGC TTC CAC GTG CCG  
 CGG TGC CTT GCC ATG TGC GAA GAG ATG CTG AGC GCC  
 15 CTG CTG AGC CGC CTC GCC TAG

⑥ アシルグルコサミン2-エポメラーゼをコードするDNA分子が組み込まれた組換え体ベクター。

⑦ 前記DNA分子が、前記式(A)のアミノ酸配列をコードする塩基配列又はその一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む請求項6に記載の組換え体ベクター。

(但し、上記式(A)のアミノ酸配列の一部が置換又は欠失

されたアミノ酸配列をコードする塩基配列は、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。

⑧ 前記DNAが、前記式(X)の塩基配列を含む請求項7に記載の組換え体ベクター。

5 ⑨ 請求項3に記載のDNA分子を含む組換え体ベクターを細胞に導入してなる形質転換体。

⑩ アシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を組み込んだ組換え体ベクターを細胞に導入して形質転換体とし、該形質転換体を培地に培養し、培養物中にアシルグルコサミン2-エピメラーゼを生成蓄積させ、該培養物からアシルグルコサミン2-エピメラーゼを採取するアシルグルコサミン2-エピメラーゼの製造方法。

⑪ レニン結合活性を有するアシルグルコサミン2-エピメラーゼ。

⑫ 下記(1)～(3)のいずれかに記載のポリペプチドを必須成分とする請求項11に記載のエピメラーゼ。

(1)前記式(A)で表されるアミノ酸配列を必須配列とするポリペプチド；

(2)前記式(A)で表されるアミノ酸配列の10位、13位、21位、23位、27位、33位、45位、47位、51位、71位、72位、

20 76-79位、93位、94位、101位、110位、120位、136位、137位、139位、141位、142位、145位、149位、155位、159位、162位、163位、171位、173位、174位、176位、

- 178位、187位、195位、199-202位、205位、208位、212位、  
 224  
 位、232位、234位、237位、243位、249位、258-261位、  
 263位、266位、267位、269位、270位、272位、275位、2  
 5 82位、287-289位、300位、301位、309位、317位、318位、  
 328位、329位、334位、337位、348位、363位、364位、  
 371位、392位、393位、395位、399位、401位及び402位か  
 らなる群から選ばれる少なくとも1つの位置が置換又は  
 欠失されたポリペプチド；あるいは
- 10 (3)式(A)で表されるポリペプチドのN末端又はC末端に  
 Pro Ala Pro Ser Pro Ala Pro Thr Pro Ala Cys  
 Arg Gly Ala Glu；Pro Ala Pro Leu Gly Ser Leu Pro  
 Ala Val Pro Thr Arg Glu Gly Ser Lys；またはLys Gly  
 Asn Lys Ser Trp Gln Aspが付加したポリペプチド。；
- 15 (但し、前記式(A)の一部が置換又は欠失されたポリペ  
 チドは、アシルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する。)
- ⑬ 下記(1)～(3)のいずれかのポリペプチド(但し一般  
 式(R-1)、(R-2)及び(R-3)で表されるポリペプチドを除く)。  
 (1)前記式(A)で表されるアミノ酸配列を必須配列とする  
 20 ポリペプチド；
- (2)前記式(A)で表されるアミノ酸配列の10位、13位、21  
 位、23位、27位、33位、45位、47位、51位、71位、72位、

WO 95/26399

59

PCT/JP95/00541

76-79位、93位、94位、101位、110位、120位、136位、  
 137位、139位、141位、142位、145位、149位、155位、  
 159位、162位、163位、171位、173位、174位、176位、  
 178位、187位、195位、199-202位、205位、208位、212位、  
 5 224位、232位、234位、237位、243位、249位、258-261  
 位、263位、266位、267位、269位、270位、272位、275位、  
 282位、287-289位、300位、301位、309位、317位、318位、  
 328位、329位、334位、337位、348位、363位、364位、  
 371位、392位、393位、395位、399位、401位及び402位か  
 10 らなる群から選ばれる少なくとも1つの位置が置換又は  
 欠失されたポリペプチド；あるいは  
 (3)前記式(A)で表されるポリペプチドのN末端又はC末  
 端にPro Ala Pro Ser Pro Ala Pro Thr Pro Ala Cys  
 Arg Gly Ala Glu；Pro Ala Pro Leu Gly Ser Leu Pro  
 15 Ala Val Pro Thr Arg Glu Gly Ser Lys；またはLys Gly  
 Asn Lys Ser Trp Gln Aspが付加したポリペプチド；

(R-1)

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ala Trp Lys  
 Glu Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Arg Val Val Ala  
 20 Phe Trp Met Glu His Ser His Asp Gln Glu His Gly  
 Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Glu Gly Arg Val  
 Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg

WO 95/26399

60

PCT/JP95/00541

Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Thr Phe  
Glu Arg Phe Arg His Ala Gln Leu Leu Asp Ala Ala  
Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Arg Tyr Ala Arg  
Val Ala Pro Pro Gly Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
5 Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Thr  
Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
Glu Leu Trp Arg Ala Thr Gly Glu Val Arg Tyr Gln  
Thr Glu Ala Val Glu Met Met Asp Gln Ile Val His  
Trp Val Gln Glu Asp Ala Ser Gly Leu Gly Arg Pro  
10 Gln Leu Gln Gly Ala Pro Ala Ala Glu Pro Met Ala  
Val Pro Met Met Leu Leu Asn Leu Val Glu Gln Leu  
Gly Glu Ala Asp Glu Glu Leu Ala Gly Lys Tyr Ala  
Glu Leu Gly Asp Trp Cys Ala Arg Arg Ile Leu Gln  
His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn  
15 Val Ser Glu Gly Gly Lys Glu Leu Pro Gly Cys Leu  
Gly Arg Gln Gln Asn Pro Gly His Thr Leu Glu Ala  
Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Cys Ile Arg Lys Gly  
Asp Pro Glu Leu Arg Ala His Val Ile Asp Lys Phe  
Leu Leu Leu Pro Phe His Ser Gly Trp Asp Pro Asp  
20 His Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Asn  
Phe Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Ala Met Lys Leu  
Trp Trp Pro His Ser Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu

WO 95/26399

61

PCT/JP95/00541

Met Gly Tyr Ser Asp Ser Gly Asp Pro Val Leu Leu  
Arg Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe Arg  
Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
Tyr Leu Ser Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Ser Ile  
5 Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Glu Met Leu Gly Ala  
Leu Leu Ser Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Ala  
Pro Thr Pro Ala Cys Arg Gly Ala Glu

10

( R - 2 )

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Val Trp Lys  
Gln Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Ser Val Ile Ala  
Phe Trp Met Glu His Ser His Asp Gln Glu His Gly  
Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Asp Gly Gln Val  
15 Tyr Asp His Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg  
Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Thr Phe  
Glu Arg Phe Arg Arg Val Glu Leu Leu Asp Ala Ala  
Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Ser Tyr Ala Arg  
Val Ala Pro Pro Gly Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
20 Thr Gln Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Thr  
Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
Glu Leu Trp Lys Val Thr Gly Glu Met His Tyr Gln

WO 95/26399

62

PCT/JP95/00541

Arg Glu Ala Val Glu Met Met Asp Gln Ile Ile His  
 Trp Val Arg Glu Asp Pro Ala Gly Leu Gly Arg Pro  
 Gln Leu Ser Gly Thr Leu Ala Thr Glu Pro Met Ala  
 Val Pro Met Met Leu Leu Asn Leu Val Glu Gln Leu  
 5 Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Thr Asp Lys Tyr Ala  
 Glu Leu Gly Asp Trp Cys Ala His Arg Ile Leu Gln  
 His Val Gln Arg Asp Gly Gln Val Val Leu Glu Asn  
 Val Ser Glu Asp Gly Lys Glu Leu Pro Gly Cys Leu  
 Gly Arg His Gln Asn Pro Gly His Thr Leu Glu Ala  
 10 Gly Trp Phe Leu Leu Gln Tyr Ala Leu Arg Lys Gly  
 Asp Pro Lys Leu Gln Arg His Ile Ile Asp Lys Phe  
 Leu Leu Leu Pro Phe His Ser Gly Trp Asp Pro Glu  
 His Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Asp  
 Leu Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Asn Met Lys Leu  
 15 Trp Trp Pro His Thr Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu  
 Met Gly Tyr Arg Asp Ser Gly Asp Pro Ala Leu Leu  
 Asn Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe His  
 Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
 Tyr Leu Asn Gln Glu Gly Lys Val Ala Leu Thr Ile  
 20 Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
 Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Gln Ile Leu Gly Ala  
 Leu Leu Gln Arg Leu Gly Pro Ala Pro Leu Gly Ser



WO 95/26399

63

PCT/JP95/00541

Leu Pro Ala Val Pro Thr Arg Glu Gly Ser Lys

( R - 3 )

Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ala Trp Lys  
5 Glu Arg Val Gly Gln Glu Leu Asp Arg Val Met Ala  
Phe Trp Leu Glu His Ser His Asp Arg Glu His Gly  
Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Asp Gly Arg Val  
Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr Val Trp Leu Gln Gly Arg  
Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Lys Leu  
10 Glu Arg Phe His Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Ala  
Lys Ala Gly Gly Glu Phe Leu Leu Arg His Ala Arg  
Val Ala Pro Pro Glu Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Ser  
Ile Phe Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Met Ala Met Asn  
15 Glu Leu Trp Arg Val Thr Ala Glu Ala Arg Tyr Gln  
Ser Glu Ala Val Glu Met Met Asp Gln Ile Val His  
Trp Val Arg Glu Asp Pro Ser Gly Leu Gly Arg Pro  
Gln Leu Pro Gly Ala Val Ala Ser Glu Ser Met Ala  
Val Pro Met Met Leu Leu Cys Leu Val Glu Gln Leu  
20 Gly Glu Glu Asp Glu Glu Leu Ala Gly Arg Tyr Ala  
Gln Leu Gly His Trp Cys Ala Arg Arg Ile Leu Gln  
His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn

WO 95/26399

64

PCT/JP95/00541

Val Ser Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ser Gly Cys Leu  
 Gly Arg His Gln Asn Pro Gly His Ala Leu Glu Ala  
 Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Ser Ser Arg Ser Gly  
 Asp Ala Lys Leu Arg Ala His Val Ile Asp Thr Phe  
 5 Leu Leu Leu Pro Phe Arg Ser Gly Trp Asp Ala Asp  
 Tyr Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Gly  
 Leu Cys Pro Thr Gln Leu Glu Trp Ala Met Lys Leu  
 Trp Trp Pro His Arg Gln Ala Met Ile Ala Phe Leu  
 Met Gly Tyr Ser Glu Ser Gly Asp Pro Ala Leu Leu  
 10 Arg Leu Phe Tyr Gln Val Ala Glu Tyr Thr Phe Arg  
 Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly  
 Tyr Leu Asn Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Thr Ile  
 Lys Gly Gly Pro Phe Lys Gly Cys Phe His Val Pro  
 Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Glu Met Leu Ser Ala  
 15 Leu Leu Ser Arg Leu Ala

⑭ 請求項13に記載のポリペプチドをコードするDNA分子。

⑮ 前記式(X)で表される塩基配列を有する請求項14に記載のDNA分子。

20 ⑯ 請求項14又は15に記載のアシルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子が組み込まれた組換え体ベクター。

⑰ 請求項16に記載の組換え体ベクターを細胞に導入し

てなる形質転換体。

⑮ 請求項12に記載のレニン結合活性を有するアシルグルコサ  
ミン2-エピメラーゼをコードするDNA分子を組み込んだ組換  
え体ベクターを細胞に導入して形質転換体とし、該形質  
5 転換体を培地に培養し、培養物中にアシルグルコサミン2-エピメラー  
ゼを生成蓄積させ、該培養物からアシルグルコサミン2-エピメラーゼ  
を採取するレニン結合活性を有するアシルグルコサミン2-エピメラー  
ゼの製造方法。

⑯ 請求項11又は12に記載のアシルグルコサミン2-エピメラーゼ又は  
10 その誘導体を必須成分とする降圧剤。

⑰ レニン結合活性を有する蛋白質を必須成分とする、  
N-アセチルグルコサミンからN-アセチルマンノサミンへの変換を行うエピメリ  
化剤。

⑱ N-アセチルグルコサミンにレニン結合活性を有する蛋白質を作  
15 用させることを特徴とするN-アセチルマンノサミンの製造法。

⑳ N-アセチルグルコサミンとピルビン酸にレニン結合活性を有す  
る蛋白質及びN-アセチルノイラミン酸を作用させることを特徴  
とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

WO 95/26399

1 / 4

PCT/JP95/00541

## F I G. 1 (1)

5' ATG GAG AAG GAG CGC GAA ACT CTG CAG GCC TGG AAG GAG CGT GTG GGC CAA GAG  
 --- Met Glu Lys Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ala Trp Lys Glu Arg Val Gly Gln Glu  
  
 CTG GAC CGC GTG ATG GCT TTC TGG CTG GAG CAC TCC CAC GAT CGG GAG CAC GGG  
 --- Leu Asp Arg Val Met Ala Phe Trp Leu Glu His Ser His Asp Arg Glu His Gly  
  
 GGC TTC TTC ACG TGC CTG GGC CGC GAC GGG CGG GTG TAT GAC GAC CTC AAG TAC  
 --- Gly Phe Phe Thr Cys Leu Gly Arg Asp Gly Arg Val Tyr Asp Asp Leu Lys Tyr  
  
 GTC TGG CTG CAG GGG AGG CAG GTG TGG ATG TAC TGT CGC CTG TAC CGC AAG CTT  
 --- Val Trp Leu Gln Gly Arg Gln Val Trp Met Tyr Cys Arg Leu Tyr Arg Lys Leu  
  
 GAG CGC TTC CAC CGC CCT GAG CTT CTG GAT GCG GCT AAA GCA GGG GGC GAA TTT  
 --- Glu Arg Phe His Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Glu Phe  
  
 TTG CTG CGC CAT GCC CGA GTG GCA CCT CCT GAA AAG AAG TGT GCC TTT GTG CTG  
 --- Leu Leu Arg His Ala Arg Val Ala Pro Pro Glu Lys Lys Cys Ala Phe Val Leu  
  
 ACG CGG GAC GGC CGG CCC GTC AAG GTG CAG CGG AGC ATC TTC AGT GAG TGC TTC  
 --- Thr Arg Asp Gly Arg Pro Val Lys Val Gln Arg Ser Ile Phe Ser Glu Cys Phe  
  
 TAC ACC ATG GCC ATG AAC GAG CTG TGG AGG GTG ACG GCG GAG GCA CGG TAC CAG  
 --- Tyr Thr Met Ala Met Asn Glu Leu Trp Arg Val Thr Ala Glu Ala Arg Tyr Gln  
  
 AGC GAA GCG GTG GAC ATG ATG GAT CAG ATC GTG CAC TGG GTG CGA GAG GAC CCC  
 --- Ser Glu Ala Val Asp Met Met Asp Gln Ile Val His Trp Val Arg Glu Asp Pro  
  
 TCT GGG CTG GGC CGG CCC CAG CTC CCC GGG GCC GTG GCC TCG GAG TCC ATG GCA  
 --- Ser Gly Leu Gly Arg Pro Gln Leu Pro Gly Ala Val Ala Ser Glu Ser Met Ala  
  
 GTG CCC ATG ATG CTG CTG TGC CTG GTG GAG CAG CTC GGG GAG GAG GAC GAG GAG  
 --- Val Pro Met Met Leu Leu Cys Leu Val Glu Gln Leu Gly Glu Glu Asp Glu Glu  
  
 CTG GCA GGC CGC TAC GCG CAG CTG GGG CAC TGG TGC GCT CGG AGG ATC CTG CAG  
 --- Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Gln Leu Gly His Trp Cys Ala Arg Arg Ile Leu Gln  
  
 CAC GTC CAG AGG GAT GGA CAG GCT GTG CTG GAG AAT GTG TCG GAA GAT GGC GAG  
 --- His Val Gln Arg Asp Gly Gln Ala Val Leu Glu Asn Val Ser Glu Asp Gly Glu

WO 95/26399

2 / 4

PCT/JP95/00541

# FIG. 1 (2)

GAA CTT TCT GGC TGC CTG GGG AGA CAC CAG AAC CCA GGC CAC GCG CTG GAA GCT  
 ---  
 Glu Leu Ser Gly Cys Leu Gly Arg His Gln Asn Pro Gly His Ala Leu Glu Ala

GGC TGG TTC CTG CTC CGC CAC AGC AGC CGG AGC GGT GAC GCC AAA CTT CGA GCC  
 ---  
 Gly Trp Phe Leu Leu Arg His Ser Ser Arg Ser Gly Asp Ala Lys Leu Arg Ala

CAC GTC ATC GAC ACG TTC CTG CTA CTG CCT TTC CGC TCC GGA TGG GAC GCT GAT  
 ---  
 His Val Ile Asp Thr Phe Leu Leu Leu Pro Phe Arg Ser Gly Trp Asp Ala Asp

CAC GGA GGC CTC TTC TAC TTC CAG GAT GCC GAT GGC CTC TGC CCC ACC CAG CTG  
 ---  
 His Gly Gly Leu Phe Tyr Phe Gln Asp Ala Asp Gly Leu Cys Pro Thr Gln Leu

GAG TGG GCC ATG AAG CTC TGG TGG CCG CAC AGC GAA GCC ATG ATC GCC TTT CTC  
 ---  
 Glu Trp Ala Met Lys Leu Trp Trp Pro His Ser Glu Ala Met Ile Ala Phe Leu

ATG GGC TAC AGT GAG AGC GGG GAC CCT GCC TTA CTG CGT CTC TTC TAC CAG GTG  
 ---  
 Met Gly Tyr Ser Glu Ser Gly Asp Pro Ala Leu Leu Arg Leu Phe Tyr Gln Val

GCC GAG TAC ACG TTT CGC CAG TTT CGT GAT CCC GAG TAC GGG GAA TGG TTT GGC  
 ---  
 Ala Glu Tyr Thr Phe Arg Gln Phe Arg Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly

TAC CTG AAC CGA GAG GGG AAG GTT GCC CTC ACT ATC AAG GGG GGT CCC TTT AAA  
 ---  
 Tyr Leu Asn Arg Glu Gly Lys Val Ala Leu Thr Ile Lys Gly Gly Pro Phe Lys

GGC TGC TTC CAC GTG CCG CGG TGC CTT GCC ATG TGC GAA GAG ATG CTG AGC GCC  
 ---  
 Gly Cys Phe His Val Pro Arg Cys Leu Ala Met Cys Glu Glu Met Leu Ser Ala

CTG CTG AGC CGC CTC GCC TAG 3'  
 ---  
 Leu Leu Ser Arg Leu Ala \*\*\*

WO 95/26399

3 / 4

PCT/JP95/00541

FIG. 2

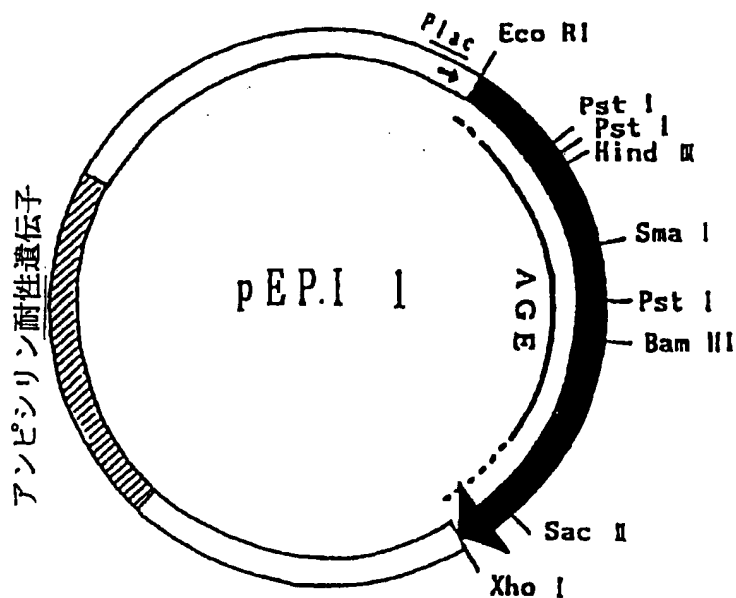
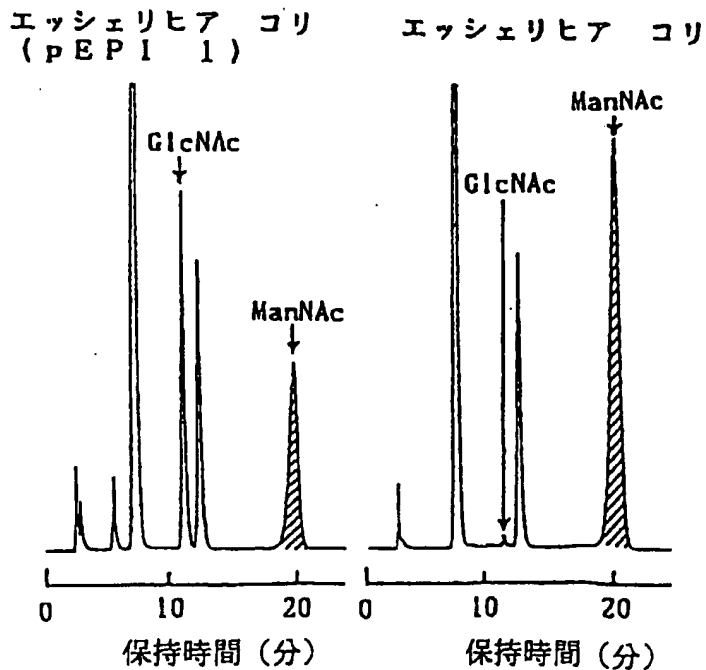


FIG. 3



WO 95/26399

4 / 4

PCT/JP95/00541

FIG. 4

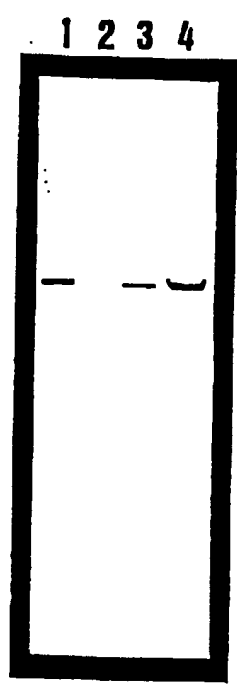
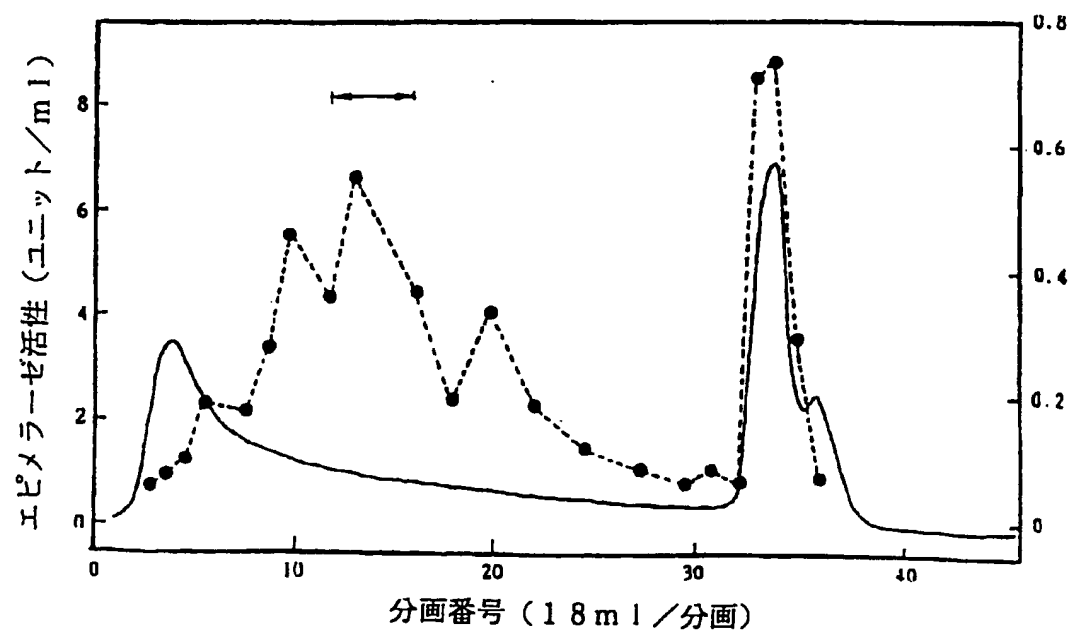


FIG. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00541

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C16 C12N9/90, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C16 C12N9/90, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, CAS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 3-180190, A (Forschungszentrum Juelich GmbH.), August 6, 1991 (06. 08. 91) & EP, 428947, A & DE, 3937891, A & AU, 9065872, A & CA, 2029984, A & US, 5071750, A & IL, 96307, A	1, 21, 22
A	Journal of Biochemistry, Vol. 110, No. 4, (1991), H. Inoue et al. "Genetic and Molecular properties of human and rat renin-binding proteins with reference to the function of the leucine zipper motif" p. 493-500	2 - 20
A	Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 12, (1990), H. Inoue et al. "Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a porcine Ridney renin-binding protein" p. 6556-61	2 - 20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 9, 1995 (09. 06. 95)

Date of mailing of the international search report

June 27, 1995 (27. 06. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP	95/00541
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. <sup>6</sup> C12N9/90, C12N15/00			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. <sup>6</sup> C12N9/90, C12N15/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS PREVIEWS, WPI, CAS			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所に関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	JP, 3-180190, A (フオルジュングスツエントルム・ユ ーリッヒ・ゲゼルシャフト・ミト・ベシュレンクテル・ハフツ グ), 6. 8月 1991 (06. 08. 91) &EP, 428947, A&DE, 3937891, A &AU, 9065872, A&CA, 2029984, A &US, 5071750, A&IL, 96307, A	1, 21, 22	
A	Journal of Biochemistry, 第110巻, 第4号,	2-20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
09. 06. 95		27.06.95	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B 9 1 5 2
		富永 みどり	
		電話番号 03-3581-1101 内線	3449

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP

95/00541

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>(1991), H. Inoue et al 「Genetic and molecular properties of human and rat renin-binding proteins with reference to the function of the leucine zipper motif」 P. 493—500</p> <p>Journal of Biological Chemistry, 第265巻, 第12号, (1990), H. Inoue et al 「Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a porcine Kidney renin-binding protein」 P. 6556—61</p>	2—20